

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Estudio de las poblaciones de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* aisladas en etapas iniciales de la producción de pollo de engorde en España: relaciones con cepas de origen clínico

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

David Pérez Boto

Madrid, 2014

Estudio de las poblaciones de
Campylobacter jejuni y *Campylobacter coli*
aisladas en etapas iniciales de la producción
de pollo de engorde en España.
Relaciones con cepas de origen clínico.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

nihil obstat quominus imprimatur

A mis padres

Índice

Índice

<i>Listado de abreviaturas</i>	IX
<i>RESUMEN DE LA TESIS</i>	XI
<i>THESIS SUMMARY</i>	XV
<i>INTRODUCCIÓN</i>	1
1. <i>Antecedentes históricos y descripción inicial del género Campylobacter spp.</i>	5
2. <i>Posición taxonómica y características principales del género Campylobacter</i>	6
2.1. <i>El género Campylobacter</i>	7
2.2. <i>Especies del género Campylobacter. Descripción de nuevas especies</i>	10
3. <i>Especies del género Campylobacter productoras de gastroenteritis en el hombre</i>	12
4. <i>Métodos de tipificación en Campylobacter jejuni y Campylobacter coli</i>	15
4.1. <i>Métodos fenotípicos. Serotipificación y Fagotipificación</i>	15
4.1.1. <i>Serotipificación</i>	15
4.1.2. <i>Fagotipificación</i>	17
4.2. <i>Métodos genotípicos. Tipificación molecular</i>	18
4.2.1. <i>RFLP-PCR de los genes flaA y flaB</i>	19
4.2.2. <i>SVR-flaA</i>	21
4.2.3. <i>PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)</i>	22
4.2.4. <i>MLST (MultiLocus Sequence Typing)</i>	26
5. <i>Campilobacteriosis en el hombre</i>	29
5.1. <i>Procesos entéricos. Tasas de campilobacteriosis</i>	29
5.2. <i>Infraestimación de datos</i>	30
5.3. <i>Fuentes de infección de C. jejuni y C. coli para el hombre</i>	31
5.4. <i>Brotes de campilobacteriosis</i>	34
6. <i>Estudios poblacionales de Campylobacter jejuni y Campylobacter coli en granjas avícolas</i>	36
6.1. <i>Prevalencia de Campylobacter en granjas avícolas</i>	36
6.2. <i>Especies del género Campylobacter aisladas en granjas</i>	40
6.3. <i>Edad de las aves y colonización por Campylobacter spp.</i>	41
6.4. <i>Fuentes de colonización de Campylobacter en granjas avícolas</i>	41
6.4.1. <i>Transmisión vertical</i>	42
6.4.2. <i>Transmisión horizontal. Fuentes bióticas y abióticas</i>	44
6.4.2.1. <i>Insectos</i>	44
6.4.2.2. <i>Manejo de los animales, actividades humanas en las granjas y estacionalidad</i>	45
6.4.2.3. <i>Aves silvestres</i>	46
6.4.2.4. <i>Ganado vacuno y porcino</i>	47

6.4.2.5.	Roedores, perros y otros mamíferos	48
6.4.2.6.	Ambiente exterior de la granja	48
6.4.2.7.	Alimentación y cama de las aves	49
6.4.2.8.	Agua y aerosoles	50
6.5.	Dinámica de poblaciones de <i>Campylobacter</i> spp. en granjas avícolas	51
6.5.1.	Diversidad de genotipos en granjas avícolas	52
6.5.2.	Cepas genéticamente estables vs. cepas inestables	52
6.5.3.	Cepas persistentes vs. cepas transitorias	53
7.	Resistencia a antimicrobianos en <i>Campylobacter jejuni</i> y <i>Campylobacter coli</i>	53
7.1.	Métodos aceptados de evaluación de resistencias a antimicrobianos en <i>Campylobacter jejuni</i> y <i>Campylobacter coli</i>	55
7.2.	Porcentajes de resistencia frente a antimicrobianos en <i>Campylobacter jejuni</i> y <i>C. coli</i> aislados en aves de consumo	58
7.2.1.	Quinolonas y fluoroquinolonas	58
7.2.2.	Macrólidos	61
7.2.3.	β -lactámicos	63
7.2.4.	Tetraciclinas	64
7.2.5.	Cloranfenicol	66
7.2.6.	Aminoglicósidos	67
7.3.	Mecanismos moleculares de resistencia en <i>Campylobacter jejuni</i> y <i>Campylobacter coli</i>	68
7.3.1.	Mecanismos moleculares de resistencia a quinolonas en <i>Campylobacter</i> spp.	69
7.3.1.1.	Quinolonas	69
7.3.1.2.	Diana de las quinolonas	70
7.3.1.3.	Mecanismos de resistencia a quinolonas en <i>Campylobacter</i> spp.	71
7.3.2.	Mecanismos moleculares de resistencia a macrólidos en <i>Campylobacter</i> spp.	74
7.3.2.1.	Macrólidos	74
7.3.2.2.	Modo de acción de los macrólidos	74
7.3.2.3.	Mecanismos de resistencia a Macrólidos en <i>Campylobacter jejuni</i> y <i>C. coli</i>	75
7.3.3.	Diferencias en el comportamiento de las poblaciones resistentes a quinolonas y macrólidos en cepas de <i>Campylobacter</i> spp. aisladas de aves	78
7.3.4.	Mecanismos moleculares de resistencia frente a tetraciclinas en <i>Campylobacter</i> spp.	79
7.3.4.1.	Tetraciclinas	79
7.3.4.2.	Modos de acción de las tetraciclinas	80
7.3.4.3.	Resistencia a tetraciclinas en <i>Campylobacter</i> spp.	80
JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS DE LA TESIS		85
Justificación del estudio		89
Objetivos de la tesis		95
CAPÍTULO I		99
Artículo 1		109
Artículo 2		121
Artículo 3		131

<i>CAPÍTULO II</i>	157
Artículo 4	161
Artículo 5	173
Artículo 6	185
<i>ARTÍCULOS ADICIONALES</i>	195
Artículo Adicional 1	197
Artículo Adicional 2	203
<i>DISCUSIÓN</i>	211
Discusión de los resultados	215
<i>CONCLUSIONES</i>	241
Conclusiones	245
<i>POSIBLES TRABAJOS FUTUROS DERIVADOS DE ESTA TESIS</i>	249
Estudio de las poblaciones de <i>Campylobacter</i> spp. a través del gen ribosómico <i>rpIV</i> y su proteína, L22	253
Estudio de las mutaciones en la zona de regulación del operón <i>cmeABC</i> y su influencia en la resistencia a diferentes antimicrobianos	255
Estudio de cepas atípicas con fenotipo Nal ^S Cip ^R	256
<i>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	257

Índice de Figuras

Figura 1: Estructura química del ácido nalidíxico (a) y del ciprofloxacino (b)	69
Figura 2: Estructura química de la eritromicina	75
Figura 3: Estructura química de la tetraciclina	79
Figura 4: Esquema del sistema de producción de carne de pollo en las granjas de estudio de la Tesis.	93
Figura 5: Esquema de la producción de pollo de engorde en España	93
Figura 6. Esquema que relaciona los objetivos planteados en la Tesis con los artículos publicados a consecuencia del estudio.....	96
Figura 7: Dendrograma generado a partir de los 196 pulsotipos diferentes (pulsotipo combinación de <i>KpnI</i> y <i>SmaI</i>) encontrados en las 662 cepas de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> tipificadas a partir de 17 lotes en 5 granjas de abuelas y de 12 lotes en 12 granjas de reproductoras	105
Figura 8: Análisis mediante MLST de los clusters 1 y 3 generados con el análisis conjunto de los pulsotipos <i>KpnI</i> y <i>SmaI</i>	106
Figura 9: Análisis mediante MLST de los clusters 4 y 5 generados con el análisis conjunto de los pulsotipos <i>KpnI</i> y <i>SmaI</i>	107
Figura 10: Comparación de la secuencia del gen <i>rpIV</i> en varias especies de <i>Campylobacter</i> spp. mediante un modelo evolutivo (<i>Maximum parsimony tree</i>).	253
Figura 11. Distribución de parte de las secuencias del gen <i>rpIV</i> analizadas usando un modelo poblacional (<i>Minimum spanning tree</i>).	254

Índice de Tablas

Tabla 1. Características fenotípicas de las diferentes especies del género <i>Campylobacter</i> spp. _____	11
Tabla 2. Datos de prevalencia de <i>Campylobacter</i> spp. en carne de pollo. _____	37
Tabla 3. Datos de prevalencia de <i>Campylobacter</i> spp. en países europeos en el año 2006, publicados en 2008, tomados del informe de la EFSA. _____	39
Tabla 4. Porcentajes de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> identificados en granjas avícolas de diferentes países europeos. _____	40
Tabla 5. Tabla resumen con las ventajas y desventajas de cada método para evaluar la susceptibilidad frente a antibióticos. _____	57
Tabla 6. Datos de resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas en cepas de origen aviar de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> de diferentes países. _____	60
Tabla 7. Datos de resistencia a macrólidos en <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> aislados de pollo en diferentes países. _____	62
Tabla 8. Datos de resistencia a β -lactámicos en <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> aislados de pollo en diferentes países. _____	63
Tabla 9. Datos de resistencia a tetraciclinas en <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> aislados de pollo en diferentes países. _____	65
Tabla 10. Datos de resistencia a cloranfenicol en <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> aislados de pollo en diferentes países. _____	67
Tabla 11. Datos de resistencia a aminoglicósidos en <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> aislados de pollo en diferentes países. _____	68
Tabla 12. Tabla resumen con las principales mutaciones encontradas en el gen <i>gyrA</i> en <i>Campylobacter</i> spp. _____	72
Tabla 13. Porcentajes de <i>tetO</i> en plásmido según diferentes estudios con cepas de origen humano o animal _____	81
Tabla 14: Tabla resumen de las granjas y lotes de aves muestreados en las dos etapas de producción seleccionadas en la Tesis: GPBF (GrandParent Breeder Farms) y PBF (Parent breeder Farms). ____	94

Índice de artículos

<i>Artículo 1</i>	109
<i>Artículo 2</i>	121
<i>Artículo 3</i>	131
<i>Artículo 4</i>	161
<i>Artículo 5</i>	173
<i>Artículo 6</i>	185

Índice de anexos

Anexo I. Producción comercial de carne de pollo. Granjas del estudio.	92
Anexo II: Establecimiento de un valor “ <i>cut-off</i> ” para determinar subtipos en el análisis de los pulstipos de <i>Campylobacter</i>	103

Listado de abreviaturas

- ♂ **AD:** Aglutinación Directa
- ♂ **ADM:** Agar Dilution Method
- ♂ **ADN:** Acido desoxirribonucleico
- ♂ **ADNr 16S:** ADN que codifica para el ARN ribosómico 16S
- ♂ **ADNr 23S:** ADN que codifica para el ARN ribosómico 23S
- ♂ **AFLP:** Amplified fragment length polymorphism
- ♂ **Agar AHB:** Agar Abeyta-Hunt-Bark
- ♂ **AMC:** Amoxicilina más ácido clavulánico
- ♂ **AMX:** Amoxicilina
- ♂ **ARN:** Ácido Ribonucleico
- ♂ **ARNr 23S:** ARN ribosómico de tamaño 23S
- ♂ **ARNt:** ARN de transferencia
- ♂ **ATCC:** American Type Culture Collection
- ♂ **ATP:** Adenosin Tri Fosfato
- ♂ **BDM:** Broth Dilution Method
- ♂ **BHI Broth:** Brain-Hearth-Infusion Broth
- ♂ **CAT:** Cefoperazone, Amphotericin and Teicoplanin
- ♂ **CC:** Complejo Clonal.
- ♂ **CCAAs:** Comunidades Autónomas
- ♂ **CHL:** Cloranfenicol
- ♂ **CIP:** Ciprofloxacino
- ♂ **CLA:** Campy-Line Agar.
- ♂ **CLBA:** Campy-Line BloodAgar.
- ♂ **CLSI:** Clinical and Laboratory Standards Institute
- ♂ **CMB:** Concentración Mínima Bactericida
- ♂ **CMI:** Concentración Mínima Inhibitoria
- ♂ **CNM:** Centro Nacional de Microbiología
- ♂ **DANMAP:** Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme
- ♂ **DDM:** Disk Difusion Method (también conocido por Método de Kirby-Bauer)
- ♂ **DMSO:** DiMetil sulfóxido
- ♂ **EFSA:** European Food Safety Authority
- ♂ **ERY:** Eritromicina
- ♂ **EU:** European Union
- ♂ **EUCAST:** European Commitee for Antimicrobial Susceptibility Testing
- ♂ **FBP:** Ferrous sulphate, sodium metabisulphate and sodium pyruvate
- ♂ **FDA:** Food and Drug Administration
- ♂ **GEN:** Gentamicina
- ♂ **GGPBF:** Great GrandParent Breeder Broiler Farms
- ♂ **GPBF:** GrandParent Breeder Broiler Farms
- ♂ **HAP:** Hemaglutinación Pasiva
- ♂ **HRM:** High Resolution Melting
- ♂ **IgA:** Inmunoglobulina A
- ♂ **IgG:** Inmunoglobulina G
- ♂ **IR region:** Región Inversa repetida de la zona de regulación del operón *cmeABC*
- ♂ **LOS:** Lipooligosacarido.
- ♂ **LPS:** Lipopolisacárido.
- ♂ **mCCDA:** modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar

- ♂ **MDR:** MultiDrug Resistant
- ♂ **MIC:** Minimal Inhibitory Concentration
- ♂ **MLEE:** MulltiLocus Enzyme Electrophoresis
- ♂ **MLKSO:** Grupo de antibiótico formado por Macrólidos-Lincosamidas-Ketólidos-Estreptogramina y Oxazolidinona
- ♂ **MLST:** MultiLocus Sequence Typing
- ♂ **MST:** Minimum Spanning Tree
- ♂ **NAL:** Ácido Nalidíxico
- ♂ **NBT/BCIP:** Nitro blue tetrazolium chloride/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
- ♂ **OMS:** Organización Mundial de la Salud
- ♂ **PanS:** Cepa susceptible a todos los antibióticos testados
- ♂ **PA N:** Phe-Arg- -Naftilamida.
- ♂ **PBF:** Parent Breeder Broiler Farms
- ♂ **PCR:** Polymerase Chain Reaction
- ♂ **PF:** Pedigree Farms
- ♂ **PFGE:** Pulsed Field Gel Electrophoresis
- ♂ **PPLO:** Pleuropneumonia-like Organism
- ♂ **PPR:** Proteínas Protectoras del Ribosoma
- ♂ **QRDR:** Quinolone-Resistance Determining Region
- ♂ **RAPD:** Random Amplified Polymorphic DNA
- ♂ **RFLP-*flaA*:** Sinónimo de RFLP-PCR-*flaA*
- ♂ **RFLP-PCR:** Restriction Fragment Length Polymorphism-Polymerase Chain Reaction
- ♂ **RND:** Resistance-Nodulation-Division
- ♂ **SDS-PAGE:** Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis
- ♂ **SOD:** Super Óxido Dismutasa
- ♂ **ST:** Secuenciotipo
- ♂ **SVR-*flaA*:** Short Variable Region of *flaA* gene
- ♂ **SVR-*flaB*:** Short Variable Region of *flaB* gene
- ♂ **TAE:** Tris Acetate EDTA
- ♂ **TBE:** Tris Borate EDTA
- ♂ **TCY:** Tetraciclina
- ♂ **TSI:** Triple Sugar Iron
- ♂ **TTC:** Cloruro de Trifenil Tetrazolio
- ♂ **UPGMA:** Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
- ♂ **VBNC:** Viable But Not Culturable. Célula viable, pero en estado no cultivable
- ♂ **WHONET:** World Health Organization-NET

RESUMEN DE LA TESIS

Las campilobacteriosis son consideradas como la principal gastroenteritis de origen bacteriano en los países desarrollados. El consumo o manipulación de carne de pollo contaminada con *Campylobacter jejuni* o *Campylobacter coli* es la principal causa de infección para el hombre, lo que hace que la obtención de canales de pollo libres de *Campylobacter* spp. sea un objetivo en Salud Pública.

En la presente Tesis se abordan aspectos del estudio de las poblaciones de *Campylobacter* en dos etapas previas de la producción de pollos de engorde (Granjas de abuelas y madres reproductoras: GPBFs y PBFs, respectivamente) como son la prevalencia (porcentaje de cepas colonizadas), especies implicadas, fuentes de colonización, dinámica de poblaciones, resistencia a antimicrobianos y relación con cepas de origen clínico.

En nuestro trabajo la especie aislada de forma mayoritaria fue *C. jejuni*, que colonizó de forma exclusiva tres de las cinco granjas constitutivas de la etapa GPBF. En PBFs, además, se aisló también la especie *C. coli* en 6 de los 12 lotes muestreados, con porcentajes variables dentro de cada lote (20-100%).

En GPBFs observamos que la prevalencia (en cuanto a número de aves colonizadas por lote) es dependiente de la edad de las aves. De forma general, hasta la semana 20 no existe colonización, posteriormente, entre la semana 20-30 se alcanzan porcentajes cercanos al 30%. Al final de la vida productiva de las aves (60 semanas) las prevalencias son cercanas al 100%. En PBFs no se observa esa dependencia de la edad, apareciendo prevalencias muy elevadas a edades tempranas de las aves. La heterogeneidad en cuanto a bioseguridad de las granjas (PBFs), hacen que la detección de aves colonizadas no dependa de la edad. Consiguiendo un retraso en la colonización hasta la semana 18-20 como en GPBFs, para todas las etapas de producción, se conseguirían lotes de *broilers* libres de *Campylobacter* en matadero (5-7 semanas).

La relación epidemiológica entre las cepas del estudio se ha realizado mediante el empleo de varios marcadores moleculares (RFLP-PCR-*flaA*, PFGE, MLST y SVR-*flaA*), así como del perfil de resistencia a antibióticos (resistotipo) en algunos casos.

En cuanto al estudio de las fuentes de colonización de las aves en GPBFs, se determinó en una ocasión al agua de bebida como origen de la colonización por *C. coli*. En todo el estudio solo se consiguió otro aislamiento ambiental positivo (*C. jejuni*) en el foso de desinfección de ruedas de los vehículos que entran en una de las granjas; en este caso pudimos demostrar la dirección de colonización gracias al uso del resistotipo. En las dos fuentes de colonización identificadas se aislaron también cepas de *C. jejuni* ambientales, posiblemente no colonizadoras de las aves.

En cuanto a la dinámica de poblaciones de *C. jejuni*, en dos granjas de GPBFs hubo cepas que persistían a lo largo de la vida del ave, incluso entre diferentes lotes, pese a los periodos de vaciado sanitario. Por otra parte hubo cepas transitorias, con aislamiento solo en uno de los muestreos llevados a cabo. Se evidencia el distinto potencial de supervivencia y/o colonización de las cepas aisladas en las granjas del estudio.

Mediante una búsqueda de perfiles de RFLP-PCR-*flaA* (tipos *flaA*) comunes en cepas de origen aviar y clínico, se encontró un grupo de *C. coli* que compartía el mismo tipo *flaA*. Gracias al uso de otros marcadores moleculares pudimos establecer un grupo clonal de *C. coli* de origen clínico y aviar, muy repartido geográficamente en España y aislado en muestras clínicas a lo largo del periodo 2002-2007.

Se estudiaron los porcentajes de resistencia frente a seis grupos de antimicrobianos en las cepas de origen aviar. Un 10.3% de las cepas fueron pansusceptibles, mientras que un 14.4% eran multiresistentes. La resistencia a quinolonas fue la más elevada (73.9-74.9%), pero inferior a estudios previos en nuestro país. Los porcentajes de resistencia frente a tetraciclina, amoxicilina y eritromicina fueron comparables a los de otros países europeos. Destacamos las diferencias para las dos especies aisladas, siendo *C. coli* más resistente a eritromicina y tetraciclina, así como más multiresistente. Destacan las diferencias entre las dos etapas de producción, así, en PBFs hay un mayor porcentaje de resistencia a todos los antimicrobianos, mayor porcentaje de multiresistentes, menor de pansusceptibles y es donde se aisló la única población resistente a eritromicina (*C. coli*).

El mecanismo molecular de resistencia frente a las quinolonas en las cepas del estudio fue la mutación Thr86Ile en *gyrA*, que es el más prevalente en *Campylobacter* spp. Para los macrólidos, la mutación A2075G en el gen *rrn* fue la responsable de la resistencia, con valores de CMI muy elevados (>256 mg/L). Hubo mayor variación en las CMIs frente a tetraciclina, aunque en todas las cepas resistentes se detectó el gen *tetO* (en plásmidos y cromosoma). No se encontró relación entre la especie/localización del gen *tetO* y valor de CMI. Se demostró la naturaleza transmisible de una selección de plásmidos de resistencia a tetraciclina.

El estudio de la resistencia a macrólidos en cepas de origen clínico arrojó resultados de prevalencia bajos y similares a los de otros países europeos, así como a los obtenidos en aves. El mecanismo de resistencia mayoritario fue la mutación A2075G en el gen *rrn*, aunque también se aislaron dos cepas con la mutación A2074G. No se encontró ninguna mutación descrita en los genes ribosómicos *rpID* y *rpIV*.

THESIS SUMMARY

Campylobacteriosis are considered as the main gastroenteritis of bacterial origin in developed countries. Handling or consumption of contaminated chicken meat with *Campylobacter jejuni* or *Campylobacter coli* are the main cause of human infection. Therefore it is an objective in Public Health obtaining chicken meat *Campylobacter*-free.

In this Thesis, different aspects of *Campylobacter* populations from two initial stages of broiler production (*Grandparent Breeder Farms* y *Parent Breeder Farms*: GPBFs and PBFs, respectively) in Spain were addressed. This included the prevalence (percentage of colonized birds), species implicated, sources of colonization, dynamic of populations, antimicrobial resistance, and relationships with other *Campylobacter* strains from clinical origin.

In our study, *C. jejuni* was the main species isolated, which colonized exclusively three out of five farms from GPBF. In PBFs, *C. coli* were isolated in six out of twelve sampled flocks, with varying percentages in each flock (20-100%).

Among GPBFs we observed that the prevalence (in terms of number of colonized birds per flock) is dependent on the age of the birds. Generally, until the 20 week there is not colonization, then, between weeks 20-30, prevalences near to 30% are reached. At the end of the productive life of birds (60 weeks old) prevalences are close to 100%. In PBF stage this age dependency is not observed, appearing very high prevalences at early ages of the birds. The heterogeneity in farm biosecurity (PBFs) makes the detection of colonized birds not related with their age. Reaching a delay of the colonization until the week 18-20, as in GPBFs, for all the stages of production would aid to obtain broiler flocks free of *Campylobacter* at slaughterhouse (5-7 weeks-old).

The epidemiological relationship between the strains from the study was carried out using various molecular markers (RFLP-PCR-*flaA*, PFGE, MLST y SVR-*flaA*), and with the profile of resistance to antimicrobials (resistotype) in some cases.

Regarding the study of the sources of colonization in birds from GPBFs, it was determined on one occasion the drinking water as the source of *C. coli* colonization. Throughout the study, only another positive environmental isolation was obtained (*C. jejuni*) from the water inside the dip where trucks are disinfected in one of the farms. In this case, we were able to demonstrate the direction of colonization with the use of the resistotype. In both environmental sources, other *C. jejuni* strains were isolated, possibly of non-colonizing nature.

With regard the dynamic of populations of *C. jejuni*, in two GPBF farms there were persistent strains throughout the productive life of the birds, even between different flocks, despite the depopulation periods. Moreover, there were transient strains, with isolation only in one of the samplings performed in each flock. The different potential for survival and/or colonization of the strains in the study was evidenced.

Through a search of common RFLP-PCR-*flaA* profiles (*flaA* types) among strains of clinical and avian origin, a group of *C. coli* sharing the same *flaA* type was found. By using different molecular markers we were able to establish a *C. coli* clonal group of clinical and avian origin, widely spread geographically in Spain along the period 2002-2007.

The percentages of resistance in strains of avian origin against six groups of antimicrobials were studied. 10.3% of the strains were pansusceptible, while 14.4% were multiresistant. Resistance to quinolones was highest (73.9-74.9%), but lower than previous studies in our country. The percentages of resistance to tetracycline, amoxicillin and erythromycin were comparable to those of other European countries. We highlight the differences for the two isolated species, being *C. coli* more resistant to erythromycin and tetracycline and more multiresistant. Differences in resistance between production stage are highlighted, thus, in PBFs there is higher resistance for all the antimicrobials, higher percentage of multiresistant, smaller of pansusceptible and where the only population resistant to erythromycin (*C. coli*) was isolated.

The molecular mechanism of resistance against quinolones in the strains of the study was the mutation Thr86Ile in *gyrA*, which is the most prevalent in *Campylobacter* spp. Regarding the macrolides, the mutation A2075G in the *rrn* gene was the responsible of the resistance, with very high MIC values (>256 mg/L). There was more variation in the MICs against tetracycline, although in all the resistant strains *tetO* gene was detected (in plasmids and chromosome). No relationship between the species/location of the gene and the MIC value was found. The transmissible nature of a selection of tetracycline resistant plasmids was demonstrated.

The study of macrolide resistance in clinical strains showed low prevalence values, similar to those from other European countries as well as those obtained in broilers. The main resistance mechanism was the mutation A2075G in *rrn* gene, although two strains carrying the mutation A2074G were also isolated. None of the described mutations in ribosomal genes *rplD* and *rplV* was found.

INTRODUCCIÓN



What you see is that the most outstanding feature of
life's history is a constant domination by bacteria.

Stephen Jay Gould

1. Antecedentes históricos y descripción inicial del género

Campylobacter spp.

La primera descripción de bacterias que podrían pertenecer al género *Campylobacter* parece datar de 1886, por parte de Escherich, el cual observó microscópicamente bacterias con formas espirales en heces de niños afectados por lo que denominaban “*cholera infantum*”³⁷.

Sin embargo, la primera descripción probablemente verdadera de *Campylobacter* proviene de 1909, en un estudio por parte de McFadyean y Stockman a partir de muestras de abortos en ovejas. En dicho estudio, se describía una bacteria con morfología vibrionácea, que se aislaba con mucha frecuencia en fetos abortados de ovejas y otro tipo de ganado. Posteriores estudios fueron capaces de aislar bacterias con la misma morfología, siempre a partir de abortos animales³⁷.

Debido a las pérdidas económicas que causaba en el ganado vacuno y ovino, ya que provocaba abortos e infertilidad en las hembras, esta bacteria se estudió en sus inicios en un ámbito puramente veterinario. Su primera denominación fue en el año 1919, conociéndose como *Vibrio fetus*³⁷⁷, y en el año 1959 se distinguían dos subespecies de *V. fetus*: *V. fetus intestinalis* y *V. fetus venerealis*. Esta diferenciación se realizó en base a la diferente bioquímica y patogenicidad de ambas subespecies.

Dentro del género *Campylobacter*, la especie más estudiada y predominante en gastroenteritis en humanos, *Campylobacter jejuni*, fue descrita como *Vibrio jejuni* por primera vez en 1931, por Jones y colaboradores, aunque no en casos clínicos, sino a partir de muestras de origen vacuno en ganado afectado de disentería¹⁹². La primera descripción documentada de infección en humanos por *Campylobacter*, proviene del estudio de un brote, asociado al consumo de leche, en los reclusos de dos cárceles en EEUU en 1938²²⁰. La denominación de “*Campylobacter*” (Del griego *kampulos*: curvado y *bacter*: bastón) fue propuesta por Sebald y Véron en 1963³⁶⁰.

El paso crucial para la descripción, cultivo y aislamiento de especies del género *Campylobacter* a partir de heces o sangre de pacientes fue el empleo de técnicas de filtración y de medios de cultivo selectivos. Así, podemos considerar que a partir de los trabajos de Butzler y Dekeyser en la década de los 70, comenzó el aislamiento de forma rutinaria de aquellas especies de *Campylobacter* que causan infección intestinal. Finalmente, a mediados de la década de los 80 se estableció que, sorprendentemente, y pese a haber sido ignorado en la microbiología clínica por tantas décadas, *Campylobacter jejuni* era la principal causa de gastroenteritis bacteriana en el hombre.

En los inicios del aislamiento de especies del género *Campylobacter* se usaron medios de tipo selectivo, diseñados de forma principal para *C. jejuni* y *C. coli*. Estos medios pueden provocar un infra-aislamiento de otras especies del género *Campylobacter* causantes de gastroenteritis en el hombre. Estudios basados en metagenómica han encontrado una cantidad considerable de ADN perteneciente a *Campylobacter* spp. en muestras de heces en las que, posteriormente, ha sido imposible realizar el aislamiento de ninguna especie de *Campylobacter* mediante medios selectivos ²⁶².

En la actualidad se recomienda no aislar *Campylobacter* por medios selectivos de forma exclusiva, sino apoyarnos también en métodos de filtración ²³⁵. De hecho, en el año 2000 se propuso el denominado “*Cape Town protocol*” para el aislamiento de especies de *Campylobacter*, basándose en métodos de filtración y medios sin antibióticos. Con este protocolo no solo se consigue el aislamiento de especies generalmente sensibles a los antibióticos utilizados en los medios selectivos más comúnmente usados, sino que incluso se aumenta el porcentaje de aislamientos positivos en las dos especies principales (*C. jejuni* y *C. coli*). Gracias a las técnicas de filtración se ha asociado la presencia de *Campylobacter concisus* con el síndrome de colon irritable ^{211,239}, o incluso un incremento significativo en el aislamiento de *C. upsaliensis* a partir de heces de pacientes con gastroenteritis ²¹², dos especies que de forma rutinaria no son aisladas en microbiología clínica.

Actualmente se proponen mejoras técnicas, mediante el uso de filtros hidrofóbicos de 0.45 micras o similares ^{28,405}. También son recomendables, aún con las limitaciones económicas que conllevan, aquellos métodos de aislamiento basados en técnicas inmunológicas ²⁸.

2. Posición taxonómica y características principales del género *Campylobacter*

El análisis de la secuencia del ADN ribosómico 16S dentro del *phylum Proteobacteria* genera cinco clases diferenciadas, siendo una de ellas las Epsilonbacterias (ϵ -proteobacterias). Dentro de esta clase podemos encontrar dos órdenes: *Campylobacterales* y *Nautiliales*.

Las ϵ -proteobacterias no poseen unas características bioquímicas o fisiológicas propias y distintivas, por lo que su clasificación se produce por semejanzas en la secuencia del ADNr 16S. Aunque sin duda, es reseñable que todas ellas poseen una capacidad extraordinaria de empleo de muchas moléculas como donantes y aceptores de electrones en su metabolismo. Esta variedad incluye tanto a moléculas orgánicas como inorgánicas, no en vano, podemos encontrar tanto especies autotróficas como heterotróficas y mixotróficas ¹⁴⁶. Son bacterias que en muchos casos van a jugar un importante papel en el ciclo del carbono, nitrógeno y

azufre⁴⁷. Esta variedad metabólica les posibilita colonizar diferentes nichos ecológicos, tanto en ambientes extremos marinos como en el tracto digestivo de múltiples hospedadores ¹⁰⁹.

Las ϵ -proteobacterias, además de dos Órdenes bien definidos (*Campylobacterales* y *Nautiliales*), poseen una serie de géneros que no se han asociado a ninguno de estos Órdenes establecidos y que poseen características bioquímicas como la reducción de azufre, nitratos, etc: *Nitratiruptor* spp., *Sulfurovum* spp., y *Thioreductor* spp. entre otros (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=29547&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock> Último acceso 14-04-2014).

De entre las características del Orden *Campylobacterales* podríamos reseñar que las bacterias son de morfología curvada o espiral (excepto en el género *Thiovulum* spp.), con alta diversidad metabólica y ecológica y que incluyen además diferentes especies patógenas para el hombre y los animales. Dicho Orden comprende tres familias: *Campylobacteraceae*, *Helicobacteraceae* y *Hydrogenomonaceae*.

Dentro de la familia *Campylobacteraceae*, encontramos los géneros: *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Sulfurospirillum* y “*Candidatus* Thioturbo” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=72294&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock> último acceso 14-04-2014).

El Orden *Nautiliales* comprende géneros como *Nautilia*, *Lebetimonas* y *Caminibacter*, los cuales son propios de ambientes extremos marinos ¹³⁴.

2.1. El género *Campylobacter*

Las características del género *Campylobacter* han sido reescritas por VanDamme y colaboradores en el año 2010 ⁴¹¹ al incorporar la especie *Bacteroides ureolyticus* (ahora denominada como *Campylobacter ureolyticus*) al género *Campylobacter*.

Las bacterias pertenecientes al género *Campylobacter* son bacilos Gram negativos de aspecto delgado, no formadores de esporas ni pigmentos, con morfología curvada o con tendencia a adoptar una forma espiral, aunque hay especies con aspecto de bacilos rectos. Pueden formar cadenas cortas que asemejan al microscopio una S o bien la forma de alas de gaviota. Las dimensiones se encuentran entre 0.5 y 5 μm de largo y 0.2-0.8 μm de ancho.

Una característica de este género es la aparición de formas cocoides en aquellos cultivos viejos y en las denominadas formas viables-no cultivables (VBNC). Estas VBNC parecen ser una respuesta de la bacteria a condiciones de estrés como son la concentración de oxígeno atmosférico, temperaturas extremas o ausencia de nutrientes ⁴⁸. En este estado las bacterias

poseen un metabolismo respiratorio y se suponen infectivas, pero no son cultivables en ningún medio de cultivo actual (lo cual no quiere decir que no sean realmente cultivables) ²¹⁴. Existen diferentes opiniones sobre si realmente estas formas son un reflejo de una población bacteriana moribunda, un estado metabólico real o incluso un artefacto creado artificialmente en los medios de cultivo ¹⁷⁵.

Excepto *C. gracilis*, el resto de especies son móviles, con un solo flagelo (excepto *C. showae* que posee más de uno) en posición polar, de tamaño hasta tres veces el de la bacteria. Debido a este flagelo y a la forma de la envoltura bacteriana, el movimiento de *Campylobacter* spp. es típicamente “en sacacorchos”, cuando es visualizado en microscopio en campo oscuro o contraste de fases.

Respecto al metabolismo, son quimiorganotrofas respiratorias. La mayoría de especies son microaeróbicas, es decir, sin una cantidad mínima de oxígeno no son capaces de multiplicarse. Este requerimiento de una concentración mínima de oxígeno se debe a que *C. jejuni* posee una enzima (Ribonucleotido reductasa) que es dependiente de oxígeno y necesaria en la síntesis de ADN ³⁶¹. Las especies anaeróbicas son propias de la cavidad bucal (*C. concisus*, *C. curvus*, *C. rectus*, *C. mucosalis*, *C. showae*, *C. gracilis* y algunas cepas de *C. hyointestinalis*).

Usan preferentemente como aceptor final de electrones el oxígeno, sin embargo niveles (variables según la especie) por encima del 15% son tóxicos, esto es debido a la formación de radicales de oxígeno y peróxidos. Aunque poseen algunas enzimas antioxidantes (SOD o catalasa), estas constituyen menos de la mitad de las enzimas antioxidantes de *Escherichia coli*, siendo por tanto mucho más susceptible al estrés oxidativo que otros patógenos alimentarios como *Salmonella enterica* o *E. coli* ²¹⁴. Salvo la especie *C. gracilis* y algunas cepas de *C. concisus* y *C. showae*, todas presentan actividad oxidasa.

Poseen diferentes reductasas, principalmente de tipo periplásmico ³⁰⁷ que les permiten utilizar una variedad de aceptores finales de electrones además del oxígeno: nitratos, nitritos, sulfatos, fumarato, DMSO, sulfitos, etc ^{307,361}. Estas enzimas de tipo reductasa, no solamente ayudan en la respiración de *Campylobacter* sino que en el caso de las nitrato y nitrito reductasas están implicadas en la detoxificación de formas reactivas de nitrógeno que pudieran formarse ³⁰⁷.

Como donantes de electrones usan malato, lactato, formato, cisteína, serina, glutamina e hidrógeno. Normalmente, un medio enriquecido con hidrógeno favorece el crecimiento de *Campylobacter* y mejora la colonización del intestino de sus hospedadores por parte de *C. jejuni* ²¹⁴. En esta especie se ha observado que los sulfitos se pueden utilizar también como

donantes de electrones, algo que se pensaba restringido a aquellas especies de hábitats extremos marinos ²⁵⁹. Por tanto, la variedad de moléculas que pueden utilizar dota al género *Campylobacter* de una gran versatilidad metabólica.

No fermentan u oxidan ningún carbohidrato, ya que carecen de la enzima fosfofructoquinasa para la fermentación de azúcares ¹²⁰. Sin embargo sí poseen el resto de enzimas de la oxidación de la glucosa y de las pentosas fosfato ^{286,412}. Esto es debido a que la mayoría de estos pasos metabólicos son reversibles y se pueden utilizar tanto en degradación como en formación de azúcares *de novo*. La única excepción en el metabolismo de azúcares es la existencia de algunas cepas de *C. jejuni* capaces de metabolizar la fucosa ³⁸⁴, que es un componente de glicoproteínas como la mucina, muy abundante en el tracto intestinal.

En la obtención de energía van a utilizar intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Ciclo de Krebs), pero sobre todo, aminoácidos como serina, aspartato, glutamato y prolina (fácilmente accesibles en el intestino de las aves). Adicionalmente, algunas cepas pueden metabolizar también la glutamina y la asparagina ³⁸⁴.

El no poder fermentar u oxidar los azúcares hace que, en principio, sea difícil desarrollar medios de cultivo diferenciales para *Campylobacter*, basados en el cambio de coloración de indicadores presentes en el medio por el uso de algún azúcar. Por tanto se requieren medios con sustancias diferentes, en este sentido, recientemente, se han conseguido desarrollar dos medios de cultivo: CLA (Campy-Line agar) y CLBA (Campy-Line Blood agar), los cuales llevan una concentración no inhibitoria de cloruro de trifetil tetrazolio (TTC). Este compuesto al ser reducido por *Campylobacter* genera un color púrpura intenso en la colonia, a diferencia de otras bacterias que no pueden reducir ese compuesto ²²⁵.

Excepto *C. ureolyticus*, no hidrolizan ninguna proteína así como tampoco lípidos o lecitina. Como hemos visto, sí son capaces de degradar mucina y otros mucopolisacáridos complejos (aquellos que posean fucosa). De hecho la mucina actúa para *C. jejuni* como un agente quimioatrayente y mejora el crecimiento de esta bacteria en cultivo ¹¹⁵, así como potencia el efecto colonizador en el intestino de las aves.

2.2. Especies del género *Campylobacter*. Descripción de nuevas especies

Existen 25 especies y 8 subespecies diferentes descritas dentro del género *Campylobacter*. Desde el año 2009, se han descrito siete especies nuevas y se ha reclasificado la especie *Campylobacter lari* en dos subespecies: sbsp. *lari* y sbsp. *concheus*⁸⁷ en base a sus diferencia en el crecimiento en medios con 0.05% de safranina o 0.1% de desoxicolato de sodio (la subespecie *concheus* no es capaz de crecer en estos medios de cultivo), además de que su análisis filogenético mediante AFLP y perfiles proteicos por SDS-PAGE las sitúa en grupos o *clusters* diferentes. Así mismo, se ha reclasificado la anteriormente denominada *Bacteroides ureolyticus* como *Campylobacter ureolyticus*⁴¹¹.

La búsqueda de microorganismos en hábitats hasta ahora poco explorados, como los ecosistemas de ambos polos y en hospedadores donde podría sospecharse la presencia de *Campylobacter* ha revelado la presencia de estas nuevas especies. Así, se han descrito nuevas especies en conejo (*C. cuniculorum* sp. nov.)⁴³⁶, chimpancés (*C. troglodytis* sp. nov.)¹⁹⁸, moluscos (*C. peloridis* sp. nov.), gaviota reidora (*C. volucris* sp. nov.)⁸⁶ y albatros y pingüinos de zonas antárticas (*C. subantarcticus* sp. nov.)⁸⁵. Incluso en hospedadores tan conocidos y estudiados como el pollo o el pavo ha sido descrita recientemente una especie nueva: *Campylobacter avium* sp. nov.³³⁴. Las características fenotípicas de las especies del género *Campylobacter* se reflejan en la Tabla 1.

Esta “eclosión” de nuevas especies refuerza sin duda la idea de que las ϵ -proteobacterias y concretamente de *Campylobacter* spp. poseen la capacidad de adaptación a multitud de nichos ecológicos diferentes como son el tracto digestivo de diferentes animales.

Características	<i>C. troglodytis</i>	<i>C. ureolyticus</i>	<i>C. avium</i>	<i>C. volucris</i>	<i>C. subantarcticus</i>	<i>C. peloridis</i>	<i>C. lari</i> sbsp. <i>concheus</i>	<i>C. lari</i> sbsp. <i>lari</i>	<i>C. cuniculorum</i>	<i>C. canadiensis</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. concisus</i>	<i>C. curvus</i>	<i>C. fetus</i> sbsp. <i>fetus</i>	<i>C. fetus</i> sbsp. <i>venerealis</i>	<i>C. gracilis</i>	<i>C. helveticus</i>	<i>C. hominis</i>	<i>C. hyointestinalis</i> sbsp. <i>hyointestinalis</i>	<i>C. hyointestinalis</i> sbsp. <i>lawsonii</i>	<i>C. insulaenigrae</i>	<i>C. jejuni</i> sbsp. <i>doylei</i>	<i>C. jejuni</i> sbsp. <i>jejuni</i>	<i>C. lanienae</i>	<i>C. mucosalis</i>	<i>C. rectus</i>	<i>C. showae</i>	<i>C. sputorum</i>	<i>C. upsaliensis</i>	
α-Hemólisis	Nd	+	-	Nd	+	Nd	+	+	+	-	(-)	(-)	(-)	-	V	-	+	Nd	V	V	Nd	+	+	+	-	+	+	+	+	
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+
Catalasa	+	Nd	D	-	+	+	+	+	+	V	+	-	-	+	(+)	V	-	-	+	+	+	V	+	+	-	(-)	+	V	-	
Fosfatasa alcalina	+	-	-	-	Nd	Nd	-	-	-	-	-	V	V	-	-	-	-	-	-	(-)	Nd	-	-	+	(+)	-	-	-	-	
γ-Glutamil transferasa	-	Nd	-	Nd	Nd	Nd	-	-	-	V	-	-	Nd	-	Nd	Nd	-	Nd	-	-	Nd	-	+	Nd	Nd	Nd	Nd	-	-	
Ureasa	-	+	-	Nd	Nd	Nd	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	
Hidrólisis de:																														
• Hipurato	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(-)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
• Indoxil Acetato	-	Nd	+	-	-	Nd	Nd	Nd	+	-	+	-	V	-	-	V	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	
Reducción de:																														
• Nitrato	-	+	+	+	Nd	Nd	+	+	+	-	+	(-)	+	+	+	(+)	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	
• Selenito	-	-	-	+	-	Nd	Nd	Nd	-	Nd	V	(-)	-	(+)	-	-	-	-	+	+	Nd	-	+	+	-	+	+	+	+	
• TTC	+	-	-	-	Nd	Nd	Nd	Nd	V	Nd	+	-	V	-	-	-	-	Nd	-	-	Nd	V	+	Nd	-	-	-	-	V	
Prod. de H ₂ S (agar TSI)	Nd	-	-	-	-	Nd	Nd	Nd	-	V	-	-	(-)	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	V	+	-	
Crecimiento a/en:																														
• 25°C (microaerobiosis)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
• 37°C (microaerobiosis)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	V	+	+	
• 42°C (microaerobiosis)	+	Nd	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	(+)	V	(+)	-	V	+	(-)	+	+	-	V	+	+	+	(-)	V	+	+	
• 37°C (anaerobiosis)	Nd	-	-	Nd	+	Nd	Nd	Nd	-	+	-	+	+	(-)	V	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
• Agar Nutriente	Nd	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	(-)	+	+	+	+	(+)	Nd	+	+	Nd	+	+	Nd	+	(-)	V	+	+	
• mCCDA	Nd	+	-	D	Nd	Nd	V	+	(+)	+	+	(-)	(+)	+	+	V	+	Nd	+	+	Nd	+	+	Nd	+	-	+	(+)	+	
• Agar MacConkey	Nd	V	-	D	(-)	+	Nd	Nd	-	+	V	-	(+)	(+)	V	(+)	-	-	V	V	Nd	-	-	+	(+)	-	+	V	-	
• 1% Glicina	+	+	-	-	(+)	+	+	+	-	V	+	(-)	+	+	-	+	V	+	+	V	+	(-)	+	-	V	+	V	+	+	
• 2% NaCl	-	+	-	-	+	(+)	+	+	-	Nd	-	(-)	V	-	-	v	-	+	-	-	-	-	-	-	+	V	+	+	-	
• 1% Sales biliares	-	-	V	D	-	V	V	+	V	Nd	(+)	-	-	+	+	-	+	Nd	+	(+)	Nd	+	+	Nd	+	-	-	V	+	
Requerimientos de H ₂	Nd	+	V	Nd	-	-	Nd	Nd	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	V	V	Nd	-	-	-	+	+	+	-	-	
Resistencia a:																														
• Cefalotina	+	-	-	+	-	(-)	+	+	(+)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	(-)	-	+	-	+	+	-	-	-	-	(-)	
• Acido Nalidíxico	-	-	+	+	+	(+)	-	+	V	V	-	(+)	+	+	V	V	-	V	+	+	+	-	-	+	(+)	(+)	-	(+)	-	

Tabla 1. Características fenotípicas de las diferentes especies del género *Campylobacter* spp.. Nd: No determinado, (+): 68-95% de las cepas positivas, V: 34-67% de las cepas positivas, (-): 5-33% de las cepas positivas. En las nueve primeras columnas aparecen las últimas especies descritas. Los datos han sido tomados a partir de los trabajos de Kaur *et al* 2011¹⁹⁸, Zannoni *et al* 2009⁴³⁶, Debruyne *et al* 2010⁸⁵⁻⁸⁷, Vandamme *et al* 2010⁴¹¹ y Rossi *et al* 2009³³⁴.

3. Especies del género *Campylobacter* productoras de gastroenteritis en el hombre

Las principales especies implicadas en gastroenteritis en el hombre son *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*. Diversos estudios asignan a *C. jejuni* valores de entre un 80-95 % de las campilobacteriosis, mientras que entre un 5-10% serían debidas a *C. coli* ^{136,398}. En España, los datos disponibles indican que, en el periodo 2000-2008, un 83.2% de los casos de campilobacteriosis fueron debidos a *C. jejuni*, mientras que un 2.8 % de los casos fueron por *C. coli* (<http://revistas.isciii.es/bes/index.php/bes/article/view/252/251> Boletín Epidemiológico Semanal vol 18 n° 20 año 2010). Datos del año 2012 indican que *C. jejuni* era causante de un 80.28% de los casos, siendo un 4.04% debidas a *C. coli* (<http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=download&id=10/03/2014-ada00c92a0> Último acceso 15-04-2014). Obviamente, todos estos estudios infraestiman el porcentaje de campilobacteriosis que pueden producir otras especies diferentes a estas dos. Como reflejo de este dato, en España, durante el periodo 2000-2008, en un 13.7 % de las campilobacteriosis no se llegó a identificar la especie causante (<http://revistas.isciii.es/bes/index.php/bes/article/view/252/251> Boletín Epidemiológico Semanal vol 18 n° 20 año 2010), mientras que en el año 2012 esta cifra llegó a un 15.6% (<http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=download&id=10/03/2014-ada00c92a0> Último acceso 15-04-2014).

La especie *C. jejuni* posee dos subespecies: sbsp. *jejuni* y sbsp. *doylei* ⁴¹¹. Como podemos ver en la Tabla 1, se pueden diferenciar fenotípicamente, ya que la subespecie *doylei* es incapaz de reducir nitratos, algunas cepas pueden crecer a 42° C y es susceptible a la cefalotina. Otras características son la ausencia de actividades enzimáticas γ -glutamyl transferasa y L-arginina aril amidasa. Ambas subespecies son capaces de producir gastroenteritis, pero normalmente la subespecie *doylei* se aísla de sangre con más frecuencia que de heces.

Así, en un estudio llevado a cabo en Australia durante 5 años, se estimó que de las bacteremias producidas por *Campylobacter* o *Helicobacter*, un 85.2 % eran causadas por *C. jejuni* ssp. *doylei* ²⁸⁴. Estudios moleculares usando técnicas como AFLP o MLST parecen mostrar que la subespecie *doylei* es un grupo filogenéticamente distinto a la subespecie *jejuni* ^{101,284}. Las cepas disponibles de la subespecie *doylei* son exclusivamente de origen humano, sin que se conozca todavía el posible nicho ecológico o reservorio de la subespecie ²⁸⁴. Por lo general, como vemos, no se llega a un nivel de clasificación de subespecie tanto en microbiología clínica como veterinaria, por lo tanto es difícil establecer, qué porcentajes reales de campilobacteriosis produce cada subespecie.

Las características de las infecciones provocadas en el hombre por *C. jejuni* y *C. coli* así como las fuentes de infección, se tratarán más extensamente en el apartado 5. A continuación se reseñan aquellas especies productoras de gastroenteritis que se identifican con menos frecuencia. Estas especies son las denominadas especies “crípticas”¹⁸¹.

La implicación de especies crípticas de *Campylobacter* en gastroenteritis es difícil de demostrar debido a que, normalmente, requieren incubaciones mucho más prolongadas que para *C. jejuni* o *C. coli*. Además, muchas de estas especies necesitan también variaciones en las condiciones de crecimiento con respecto a *C. jejuni* y *C. coli*, así, por ejemplo, para *C. concisus*, *C. hyointestinalis* o *C. ureolyticus* se necesita una atmósfera enriquecida en hidrógeno^{36,195}. Por último, como ya hemos comentado, los medios de cultivo selectivos para *Campylobacter* utilizados en microbiología clínica normalmente impiden el crecimiento de estas otras especies del género *Campylobacter*. Muchos de ellos contienen cefoperazona, antibiótico para el que especies como *C. hyointestinalis*, *C. fetus* y *C. upsaliensis* son sensibles¹³⁸.

Campylobacter lari es una especie termofílica con dos subespecies diferenciadas: sbsp. *lari* y sbsp. *concheus*⁸⁷. Puede colonizar el intestino de aves destinadas al consumo humano, aunque no es un comensal frecuente de estas^{191,425}. Por lo general, los porcentajes de gastroenteritis que provoca son inferiores al 1%⁴⁰⁹. En España, solamente un 0.2% de los casos informados de campilobacteriosis en el periodo 2000-2008 se atribuyeron a esta especie (<http://revistas.isciii.es/bes/index.php/bes/article/view/252/251> Boletín Epidemiológico Semanal vol 18 nº 20 año 2010), mientras que los datos del 2012 indican un único aislamiento positivo comunicado de esta especie en casos de gastroenteritis (<http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=download&id=10/03/2014-ada00c92a0> Último acceso 15-04-2014).

Campylobacter upsaliensis es una especie aislada con mucha frecuencia y en un alto número (hasta 10⁸ bacterias/gramo) en las heces de gatos y perros, tanto sanos como con síntomas de diarrea^{70,199}. Es considerada una especie causante de gastroenteritis en el hombre, provocando principalmente casos esporádicos^{208,238} aunque en ocasiones se han descrito brotes¹³⁷. Se le considera por tanto un patógeno zoonótico emergente, aunque las cifras de casos son muy bajas, por ejemplo entre un 0.7-1.2 % de los casos de gastroenteritis^{35,181}. Aunque, probablemente, debido a los problemas de aislamiento y cultivo su incidencia sea mayor de la registrada.

Campylobacter fetus es un patógeno reconocido en el ganado vacuno y ovino, provocando de forma ocasional abortos en el ganado, siendo la subespecie *venerealis* causante de infertilidad en el ganado vacuno. Su patogenidad en el hombre reside en infecciones de tipo

extraintestinal o sepsis, casi siempre asociado a pacientes inmunocomprometidos o con enfermedades de base ³³³. Los casos de gastroenteritis son muy infrecuentes ²⁸⁰ y generalmente son un síntoma concomitante a una sepsis ³⁷³. Aparece en muy bajo número en cultivos a partir de heces de pacientes con diarrea positivas a *Campylobacter*, solo un 2.4 % de las muestras ³⁵. En muchas ocasiones se halla en cultivo mixto con *C. jejuni* o *C. ureolyticus* ³⁶, por lo que su papel real en gastroenteritis es discutible. Según datos del servicio de información microbiológica español, en el 2012 se notificaron 3 únicos casos de gastroenteritis por esta especie (<http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=download&id=10/03/2014-ada00c92a0> Último acceso 15-04-2014).

Campylobacter hyointestinalis es una especie comúnmente aislada en heces de ganado vacuno ¹⁸² y que es asociada a enteritis proliferativa en ganado porcino. Su papel en gastroenteritis humanas ha sido demostrado desde los primeros aislamientos en enfermos en la década de los 80 ¹⁰³ por lo que debe ser considerado un agente zoonótico, como *C. jejuni* o *C. coli*.

Otra especie implicada en gastroenteritis, principalmente en niños pequeños, es *Campylobacter concisus* ²¹¹, originalmente aislada de cavidad bucal en infecciones periodontales. Sin embargo existe controversia con esta especie, ya que según algunos autores se aísla de igual modo tanto en individuos sanos como en pacientes con gastroenteritis ¹⁸¹. Otros opinan que es un patógeno oportunista, ya que se suele aislar de niños pequeños, ancianos y personas inmunosuprimidas ¹⁰⁸. En esta especie se desconoce su forma de transmisión, los reservorios que posee y el verdadero potencial que tiene como patógeno ²⁴³.

Campylobacter ureolyticus (antes denominado *Bacteroides ureolyticus*) ha cobrado importancia como posible patógeno para el hombre a raíz del trabajo de Bullman y colaboradores en Irlanda en el año 2011, en el cual se encontraba un sorprendente porcentaje de detección de esta especie en heces de pacientes con gastroenteritis ³⁵. Debemos considerar que en muchos casos se aísla junto a *C. jejuni*, por lo que se desconoce el papel como productor de gastroenteritis por sí mismo, o si bien aparece como bacteria comensal o incluso en coinfección junto a *C. jejuni*, potenciando la severidad del proceso entérico.

Existe un solo caso en la literatura científica de gastroenteritis (acompañada de septicemia) provocada por la especie *Campylobacter insulaenigrae* en un paciente inmunocomprometido ⁷³. Curiosamente la cepa aislada en este paciente difería en dos aspectos de la especie tipo procedente de mamíferos marinos, uno es que pueden crecer a 42°C y no en un medio con 1% de glicina ⁷³. La habilidad de multiplicarse a 42°C resalta en cierta forma el carácter termofílico que tienen las especies de *Campylobacter* patógenas para el hombre.

4. Métodos de tipificación en *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*

Los métodos de tipificación son aquellos que caracterizan la variabilidad intraespecie de un organismo ²⁶. Son herramientas imprescindibles para realizar estudios epidemiológicos en bacteriología, y con ellas podemos asignar una serie de características individuales a una cepa de tal forma que podamos compararlas con las de otras cepas de la misma especie. Son métodos muy utilizados para comparaciones de diferentes aislados clínicos con el objeto de establecer un origen común, fuentes de infección, trazabilidad de bacterias patógenas, estudios de cepas en un área geográfica, etc. Los métodos de tipificación deben cumplir una serie de características ²⁶: i) tipabilidad: la proporción de una población de cepas que pueden ser asignadas a un tipo por un método concreto, ii) poder discriminatorio: el método debe ser capaz de discriminar entre cepas que no estuvieran relacionadas, iii) reproductibilidad: proporción de cepas tipificadas de la misma manera en pruebas repetidas, preferiblemente después de un tiempo, iv) concordancia epidemiológica: aquel grupo de cepas agrupadas con un método de tipificación debe ser congruente con los datos epidemiológicos existentes y finalmente es deseable v) automatización: es aconsejable la posibilidad de automatización de los métodos para reducir la posibilidad de errores cometidos por el investigador ⁴⁰⁷.

4.1. Métodos fenotípicos. Serotipificación y Fagotipificación

Los métodos fenotípicos de tipificación son aquellos que se basan en características que expresan las bacterias. Van a estudiar propiedades de la bacteria no basadas directamente en el estudio del material genético, sino en la expresión de los genes de las bacterias. Pueden determinar características de antígenos bacterianos (serología), propiedades bioquímicas (biotipificación), sensibilidad a la lisis por bacteriófagos (fagotipificación), sensibilidad a antimicrobianos (resistotipo), etc. De forma general se recomienda que no se use únicamente un método fenotípico para tipificar un conjunto de bacterias, pero sí suele utilizarse en muchos casos como método inicial clave (por ejemplo: serología en *Salmonella*) para abordar un estudio epidemiológico. El principal inconveniente de los métodos fenotípicos es que pueden no reflejar los cambios genéticos que se han producido en una bacteria y dar a dos aislados como relacionados aunque realmente no lo estuvieran ⁴⁰⁷.

4.1.1. Serotipificación

Este método fenotípico se basa en el empleo de anticuerpos específicos para la identificación de antígenos bacterianos de superficie. Es un método universalmente reconocido como de

gran utilidad como marcador epidemiológico. Se emplea en una gran variedad de patógenos gastrointestinales, como son, entre otros, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* y *Shigella* spp.⁴³¹.

En el caso de *Campylobacter jejuni* y *C. coli* se desarrollaron en la década de los 80 esquemas de serotipificación basados en antígenos termolábiles y termoestables. Los termolábiles están basados en proteínas del flagelo (serotipos Lior)²²⁶, mientras que los termoestables se basan en antígenos capsulares y de naturaleza lipopolisacárida²⁹⁵.

La detección de estos antígenos difiere en la metodología, ya que el método de Lior se lleva a cabo mediante una aglutinación directa con bacteria viva junto con anticuerpo adsorbido y no adsorbido. En cuanto a la forma de detección de antígenos termoestables en *C. jejuni* y *C. coli*; el método de Penner se basa en una hemaglutinación pasiva (HAP) mientras que el método de Frost en una aglutinación directa (AD). El esquema de antígenos termolábiles de Lior ha sido menos empleado que el de Penner quizás por originar un mayor porcentaje de cepas no tipificables²⁹⁰.

Los antígenos termoestables de *Campylobacter*, utilizados en serotipificación, poseen características únicas para este género, ya que entre ellos pueden aparecer antígenos con propiedades de lipopolisacáridos de enterobacterias (LPS alto peso molecular), como existir otros con características de no-enterobacterias (LPS de bajo peso molecular, denominados LOS: Lipooligosacáridos)³¹².

En la literatura científica el método más citado y empleado es el HAP de Penner, que posee en la actualidad 47 serotipos de *C. jejuni*, agrupados en 22 complejos antigénicos y 18 serotipos para *C. coli*³⁰⁹.

Existe mucha variabilidad en la expresión de los genes de biosíntesis de polisacáridos en *Campylobacter* spp.³⁰⁹, lo que origina que muchas cepas al ser tipificadas pueden tener doble, triple o incluso cuádruple nomenclatura, por reacción con dos o más antisueros: O:6,7, O:23,36, O:13,16, entre otros.

La serotipificación (generalmente junto con otros métodos de tipificación) se ha empleado de forma satisfactoria en diferentes estudios:

- Estudios de relación entre cepas de *Campylobacter* procedentes de pacientes humanos y de pollo^{114,282}.
- Estudio de brotes, donde se observa que no hay variación de serotipo pese a la variabilidad detectada en este método^{118,156}.
- Estudio de distribución de serotipos en cepas de origen aviar^{269,302}.

- Epidemiología de cepas de *Campylobacter* en países o zonas geográficas concretas ^{125,197}.
- Relación entre serotipos de *C. jejuni* y los diferentes hospedadores animales que portan esas cepas ^{178,370}.
- Estudios sobre la relación entre serotipo y síndromes neurológicos como el Guillain-Barré y Miller-Fisher ²⁰⁵

Las limitaciones del método son: i) La limitada disponibilidad de los antisueros, así como su coste y calidad ii) El tiempo y el trabajo necesarios para mantener los reactivos iii) Las reacciones cruzadas que se producen entre antígenos (y entre serotipos de *C. jejuni* y *C. coli*) iv) El alto porcentaje de cepas no tipificables (hasta un 19% por el método de AD) ⁹⁰.

4.1.2. Fagotipificación

Los virus bacteriófagos, (en adelante, denominados fagos) es decir, aquellos virus que parasitan exclusivamente bacterias, son con toda seguridad las entidades biológicas más abundantes del planeta. *Campylobacter* spp. no es ajeno a esta relación de parasitismo y se han descrito más de 170 fagos capaces de infectar a las diferentes especies de este género ³⁵⁰. Los mejor caracterizados pertenecen a la familia *Myoviridae* ^{4,61} siendo de doble cadena de ADN, cabeza icosaédrica y cola rígida. Existen tanto de ciclo lítico (tras la infección de la bacteria producen la lisis de la misma) como de ciclo lisogénico (virus atemperados o profagos, donde el genoma del virus está integrado en el genoma bacteriano). Los virus lisogénicos fueron identificados por primera vez en *C. fetus*, pero están muy presentes, en estado de profago, en muchas cepas de *C. jejuni* de origen aviar ⁶². Los fagos líticos de *Campylobacter* spp. se clasifican en tres grupos según el tamaño de su genoma: grupo I (aprox 320 Kb), grupo II (180-190 Kb) y grupo III (130-140 Kb).

Al igual que en otras bacterias se han utilizado para armar un esquema de tipificación y así discriminar entre diferentes cepas de *Campylobacter*. Dos cepas poseerían el mismo fagotipo si ambas poseen el mismo patrón de reacción frente al panel de fagos probado ¹²³.

El primer esquema de fagotipificación para *Campylobacter* se desarrolló en el año 1985 en USA por Grajewski y colaboradores ¹⁴⁰, con un panel inicial de 14 fagos, aunque el esquema más utilizado se desarrolló en 1999 en el Reino Unido ¹²³. Este esquema no ha llegado a ser tan exitoso como los desarrollados para los principales serotipos de *Salmonella enterica*, existiendo una cantidad considerable de cepas de *C. jejuni* y *C. coli* que no pueden ser tipificadas, es decir, no se lisan por ninguno de los fagos del esquema ⁶².

Las limitaciones del método son en cierta forma las mismas que para la serotipificación, es decir, el panel de fagos tiene una limitada disponibilidad ya que pocos laboratorios lo poseen, la calidad de los mismos es variable, y un porcentaje considerable de cepas son no tipificables. Aún así, y sin ser muy utilizado, el método ha servido para identificar correctamente brotes de campilobacteriosis y discriminar la cepa causante del brote de otras presentes en el ambiente o en otros animales ^{123,351}.

4.2. Métodos genotípicos. Tipificación molecular

Los métodos de tipificación moleculares se basan en características del material genético de la bacteria. Como la reproducción bacteriana es asexual, mediante fisión binaria, la célula hija va a conservar el genoma de la célula madre. Al comparar dos bacterias que tengan un origen común, sus materiales genéticos deberían ser, teóricamente, iguales. Diferentes fenómenos: mutaciones, deleciones, inserciones, recombinaciones, etc, provocan variación en el material genético de las bacterias. De forma general podemos indicar que los métodos de tipificación molecular sirven para dos propósitos diferentes ²³⁷:

- i) Epidemiología localizada o a corto plazo: es aquella que investiga si dos o más cepas de la misma especie tienen un origen común. Por ejemplo, en investigación de brotes.
- ii) Epidemiología global o a largo plazo: investiga las cepas que causan enfermedad en un área geográfica concreta, y cuál es la semejanza que tienen estas cepas con otras a nivel mundial. También investigaría aspectos evolutivos de grupos poblacionales con independencia de las pequeñas variaciones temporales que podrían aparecer.

El abordaje de estos estudios requiere técnicas con un alto nivel de discriminación para asegurar que las semejanzas o diferencias observadas no van a ser debidas al azar. Este nivel de discriminación puede conseguirse con dos estrategias diferentes:

- i) Estudio de *loci* individuales (genes *flaA*, *porA*,...) o de regiones con alta variabilidad no caracterizadas a lo largo del genoma (PFGE, ribotipia, AFLP, RAPD). Esta estrategia sería muy útil para la epidemiología a corto plazo
- ii) Estudio de la variación que se acumula muy lentamente en la población y que debe ser selectivamente neutral (no debe conferir ninguna ventaja/desventaja biológica). Solamente un reducido número de *loci* cumplen con estas características, son los denominados genes *housekeeping*. Estos genes intervienen en funciones metabólicas de la bacteria y aunque, de forma teórica, no pueden acumular variaciones porque impedirían su función, alcanzan un alto nivel de discriminación si se analizan varios

loci de forma conjunta. Dos técnicas de este tipo son las denominadas MLEE y MLST. Este tipo de abordaje sería muy adecuado para los estudios de epidemiología global.

4.2.1. RFLP-PCR de los genes *flaA* y *flaB*

En *Campylobacter* spp. el flagelo no solo interviene en la movilidad de la bacteria, sino también en la colonización de hospedadores y en la patogénesis. Está constituido mayoritariamente por una proteína denominada flagelina, cuyo *locus* está formado por dos genes en tándem: *flaA* y *flaB*, los cuales poseen una homología del 95% entre sus secuencias de ADN. El gen *flaA* codifica para la flagelina, mientras que el gen *flaB* constituiría de alguna manera una “reserva genética” de variación, con la que *flaA* podría, mediante recombinación, variar su secuencia y por tanto evadir la respuesta inmune del hospedador²⁷³. En ambos genes hay una zona de variabilidad rodeada por zonas conservadas. Estas zonas conservadas, se pueden utilizar para el diseño de *primers* con los que amplificar mediante PCR fragmentos de los genes *flaA* y *flaB*. A continuación, mediante el uso de enzimas de restricción se digieren los productos de PCR generados a partir de dichos genes. Gracias a la variabilidad de la secuencia va a haber sitios de restricción diferentes, lo que generará fragmentos de diferentes tamaños, que al separarse en electroforesis en geles de agarosa y visualizarse tras tinción del ADN generarán patrones de bandas particulares para cada cepa de *Campylobacter*. Dos aislamientos con el mismo origen deberían tener el mismo patrón de bandas tras una electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos generados. Esta técnica basada en amplificación y digestión se denomina RFLP-PCR (*Restriction Fragment Length Polymorphism—Polymerase Chain Reaction*). Es una técnica relativamente barata y de poca complejidad, y no necesita un equipamiento muy costoso para un laboratorio de microbiología. Puede ser incorporada fácilmente por aquellos laboratorios que necesiten tipificar un número bajo de cepas.

La técnica fue diseñada para *Campylobacter jejuni* en 1993 por Nachamkim y colaboradores²⁶⁰. En este método se amplifica una región de 1728 pares de bases del gen *flaA* y el fragmento amplificado se digiere con la enzima de restricción *DdeI*, aunque en ocasiones se puede utilizar también la enzima *AluI* para una mayor discriminación posterior de las cepas. Aunque surgieron al menos dos técnicas basadas en RFLP-PCR para el mismo locus de la flagelina, con variaciones respecto al método original, en la comparación de los tres métodos¹⁶³ se impone el método de Nachamkim (optimizado en el año 2000⁴²⁴) por su mayor índice de discriminación y sencillez. Se recomienda no usar la enzima *AluI*, ya que genera demasiados fragmentos de pequeño tamaño y esto, aunque aumenta la discriminación, en

realidad hace difícil la estandarización y la comparación de los diferentes tipos entre laboratorios ²⁹⁹.

El principal hándicap de la técnica reside en la inestabilidad observada en el gen *flaA*, ya que se han encontrado evidencias de recombinación entre los genes de *flaA* de cepas en cocultivo ¹⁶⁴, así como recombinación entre los genes *flaA* y *flaB* dentro de una misma cepa ^{164,422}. La recombinación parece ser un fenómeno muy frecuente en *Campylobacter* spp., no en vano se estima que las tasas de recombinación en *C. jejuni* son 50 veces mayores que las mutaciones puntuales ³⁵⁸. Todo ello con el objetivo probable de generar diversidad antigénica en la bacteria. Por tanto, debido a esta inestabilidad de los genes *flaA* y *flaB*, la técnica de RFLP-PCR-*flaA* no sería teóricamente un marcador de elección en aquellos estudios poblacionales o a largo plazo, como apuntan diferentes autores ^{26,164}. Por el contrario, existen otros estudios que han constatado la estabilidad del marcador para *C. jejuni* y *C. coli* en largos periodos de tiempo ^{96,157,279}.

De entre las aplicaciones que tiene el marcador, podemos enumerar:

- Estudios en cepas de origen animal: Principalmente son estudios sobre caracterización y diversidad de genotipos de *Campylobacter* spp. en granjas de aves de consumo ^{252,326,368,369,430}, en todos ellos utilizado junto con otros marcadores como AFLP o PFGE.
- Estudios en cepas de origen humano: Uso para determinar si hay asociación entre perfil de RFLP-PCR-*flaA* con los perfiles obtenidos por otros métodos moleculares ⁴⁰⁴, para subtipificar serotipos ^{375,382} y como comparación de genotipos de cepas de origen animal y humano ^{64,283,300}.
- Estudio de brotes: Se ha utilizado para investigar los brotes de campilobacteriosis, siempre junto con otro marcador, en general PFGE, aunque también MLST ^{172,355}. Se ha observado que utilizar solamente RFLP-PCR-*flaA* podría incluir cepas de casos esporádicos en un brote, por lo que no se debería utilizar de manera exclusiva y sí, asociada a otros marcadores moleculares ¹¹⁸.

En conclusión, el método RFLP-PCR-*flaA* parece una buena primera opción para caracterizar un conjunto de cepas de *C. jejuni* o *C. coli*, sino para profundizar más en el estudio de poblaciones se hacen necesarios otros marcadores como PFGE, AFLP o MLST.

4.2.2. SVR-*flaA*

Las técnicas basadas en la comparación de secuencias de ADN poseen la ventaja frente a las que comparan fragmentos de ADN en geles de agarosa (*fingerprint*), de no ser ambiguas (no dependen de variaciones en la migración de los fragmentos), y que la comparación de las secuencias puede realizarse fácilmente entre diferentes laboratorios, eliminando teóricamente las variaciones interlaboratorios.

La técnica de RFLP-PCR-*flaA* comentada anteriormente tiene, entre otros, el hándicap de que puede haber variaciones en la secuencia del gen *flaA* que no se reflejen en el gel de agarosa si la diferencia no implica un sitio de restricción. Además existe la posibilidad de que haya digestiones parciales, diferentes movilidades según equipamiento, manejo, etc. Es lógico, por tanto, que pronto se diseñara un método de análisis basado en la secuencia del gen *flaA* que pudiera solventar estas dificultades ²⁴⁹.

La variabilidad en el gen *flaA* se concentra en dos regiones, una desde la posición 700 a la 1450 y otra de menor tamaño, denominada SVR (*Short Variable Region*), de entre las posiciones 450 a la 600, flanqueada por regiones conservadas. Estas regiones conservadas permiten diseñar oligonucleótidos para su amplificación y secuenciación. Por consenso, la región estudiada comprende 321 pares de bases cerca del extremo 5' del gen.

En la actualidad existe una base de datos accesible *via* internet (en la misma base datos se pueden también consultar y enviar secuencias de MLST) donde poder comparar las secuencias y asignar a cada nueva secuencia (nuevo alelo) una numeración (<http://pubmlst.org/campylobacter/>). Esto permite la comparación de secuencias entre diferentes laboratorios y la construcción de una base de datos internacional.

Se ha propuesto por parte de algunos autores ⁴²⁹ que la región SVR del gen *flaB* es más estable que la de *flaA*, la cual estaría sometida a demasiada variación en su secuencia. Pese a esta aparente ventaja, el uso de *flaB* no está muy extendido ^{204,429}.

La combinación de SVR-*flaA* con otras técnicas como MLST proporciona según diferentes autores una herramienta de tipificación basada en secuenciación muy adecuada tanto en estudios a corto como a largo plazo ³¹³.

La técnica se ha utilizado para caracterización de cepas de origen aviar ^{59,174}, en búsqueda de fuentes de infección en granjas ^{9,67,287} y para la comparación de cepas de origen aviar y humano ^{44,64,218,421}, en general junto con otros marcadores como MLST o PFGE.

En el caso de estudio de brotes de campilobacteriosis, no debería ser utilizado de forma exclusiva en la investigación del mismo, ya que se ha observado que podría tener demasiada variabilidad y discriminar incluso entre cepas pertenecientes al mismo brote ¹¹⁸. Sin embargo, usado en combinación con la técnica de MLST tendría un poder de discriminación equivalente a la de PFGE ^{55,348}.

Recientemente se ha propuesto una variación de esta técnica, basándose en la técnica de HRM (*High Resolution Melting*), la cual compara las curvas de desnaturalización de los fragmentos de 321 pares de bases (SVR-*flaA*) amplificados por PCR. Conseguiría en un solo paso, con un equipamiento de PCR en tiempo real, analizar y comparar las diferentes secuencias SVR problema ²⁵¹.

4.2.3. PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*)

La electroforesis en geles de agarosa es una técnica básica y de gran utilidad en cualquier laboratorio de biología molecular como técnica de separación de fragmentos de ADN. Sin embargo, existe el inconveniente de que no podemos separar de forma dependiente al tamaño a partir de un cierto tamaño molecular (~50 Kb) ¹⁷⁰. Una manera de solventar este inconveniente sería disminuir la concentración de agarosa y bajar la fuerza del campo eléctrico aplicado, pero estas soluciones no son prácticas ni manejables en la rutina del laboratorio, ni tampoco cuando esos fragmentos superan las 200 Kb. En 1983, Schwartz y Cantor idearon una solución para superar estas limitaciones, mediante la técnica de PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*). Gracias a esta técnica se pueden separar fragmentos de hasta 12 millones de pares de bases ^{170,359}.

En el método de PFGE, la dirección del campo eléctrico aplicado en la electroforesis no es unidireccional, sino que experimenta variaciones en su orientación en periodos de tiempo (pulsos) que aumentan progresivamente con el tiempo. Esto hace que las moléculas de ADN tengan que reorientarse en cada pulso para poder moverse entre los poros de la malla de agarosa. Así, en la técnica de PFGE se consigue que haya una relación directa entre el tamaño de la molécula de ADN (tamaño de fragmento) y el tiempo requerido para su reorientación (tiempo del campo eléctrico aplicado o pulso).

Cuando las moléculas de ADN se aproximan a una orientación completa reptan de un modo más efectivo, aunque dejan de depender de su tamaño en la velocidad de movimiento. Por tanto, necesitamos unos pulsos de tiempo que optimicen los periodos en los cuales estos fragmentos se muevan de un modo dependiente de su tamaño ¹⁷⁰. Modificando el rango de los pulsos utilizados así como el ángulo de reorientación, variamos el grado de separación de

los fragmentos. Por lo general, el ángulo de reorientación más usado en microbiología es de 120°.

La técnica de PFGE es considerada la técnica de referencia en tipificación molecular de microorganismos, ya que ha demostrado ser altamente efectiva para muchas especies bacterianas tanto Gram + como Gram -. En ella fragmentamos el genoma bacteriano mediante el uso de enzimas de restricción de corte poco frecuente, con la intención de generar un número moderado de fragmentos de gran tamaño. Es importante evitar la rotura mecánica del ADN, por lo que previamente a la extracción del ADN se realiza una suspensión de bacteria que es inmovilizada en una matriz de agarosa. Es aquí, embebidas en esa matriz, donde las bacterias son lisadas y el ADN digerido. Fragmentos de agarosa que contienen el ADN genómico digerido se cargan en un gel de electroforesis para su separación dependiente del tamaño. Son electroforesis que tienen una duración muy superior a las tradicionales (16-30 horas) para conseguir la separación de estos fragmentos.

Esta técnica consigue un *screening* aleatorio del genoma completo, obteniendo un perfil de bandas característico de la cepa estudiada. En el análisis posterior podemos comparar, en cierta forma, genomas completos de diferentes bacterias ¹¹³. Esto hace que la técnica de PFGE sea la de elección en investigaciones epidemiológicas, y más concretamente en el estudio de brotes alimentarios ^{232,394,398}.

Pronto surgió la necesidad de establecer un tipo de criterio para definir la relación entre cepas según las variaciones del perfil de bandas (pulsotipo). En 1995 Tenover estableció los criterios que, sin duda han sido más utilizados para definir el grado de semejanza entre dos cepas por comparación de sus pulsotipos ³⁹⁴. Los criterios fueron establecidos para examinar un número relativamente pequeño de aislamientos que pudieran formar parte de un brote. Se basaba en la idea de que un solo evento genético en el genoma puede provocar hasta 3 bandas de diferencia en un pulsotipo. Por ejemplo, imaginemos que se produce una mutación puntual que crea un nuevo sitio de restricción de la enzima elegida. Desaparecería una de las bandas y en su lugar aparecerían dos nuevas, si sabemos el número de bases (tamaño) de todas ellas, la suma de las dos nuevas debería ser igual al tamaño de la que desapareció.

Según Tenover, dependiendo del número de bandas de diferencia entre pulsotipos, podemos establecer 4 categorías de relaciones genéticas y epidemiológicas ³⁹⁴: i) Patrones indistinguibles. Todos los aislamientos representan a la misma cepa, son cepas clonales. ii) Patrones estrechamente relacionados con la cepa del brote: hasta 3 bandas de diferencia (un solo evento genético). iii) Patrones posiblemente relacionados con la cepa del brote: de 4 a 6

bandas de diferencia (la cepa aislada es posiblemente parte del brote). Esto puede ocurrir en aislamientos recogidos a lo largo de mucho tiempo, o de un gran número de pacientes en brotes muy extensos. iv) Patrones sin relación genética: menos del 50% de bandas de semejanza. Para que estos criterios sean válidos deben existir, al menos 10 bandas en el pulsotipo. Estos criterios no se pueden aplicar en el estudio de cepas con más de un año de diferencia.

Estos criterios fueron ideados en su día con respecto a bacterias causantes de brotes nosocomiales, donde pueden ser aplicados con gran éxito. Sin embargo, con las bacterias causantes de brotes alimentarios este criterio de forma general no es aplicable. La interpretación óptima de las semejanzas entre pulsotipos va a depender de varios factores, no basados en los criterios de Tenover, como son ²¹:

- a) Calidad de la imagen del patrón de bandas obtenido: debemos tener en cuenta si las diferencias observadas en los pulsotipos son reales o se deben a artefactos producidos durante la técnica. Por ejemplo, las que se producen por digestión incompleta; son bandas generalmente de menor intensidad tras la tinción y de mayor tamaño, por lo que suelen aparecer en la zona superior del gel. Además, puede haber “bandas fantasma”, de menor intensidad, que se producen por la metilación de sitios de restricción (la metilación de una base hace que no se produzca la restricción).
- b) Variabilidad intrínseca de la bacteria que estemos analizando: en el análisis de los pulsotipos es necesario considerar que bacterias muy clonales como algunos serotipos de *Salmonella enterica*, podrían dar lugar a patrones indistinguibles siendo cepas no relacionadas epidemiológicamente; o por el contrario, en bacterias con una extrema variabilidad como *Helicobacter pylori* donde pueden encontrarse pequeñas variaciones en el patrón de bandas entre cepas epidemiológicamente relacionadas ²¹.
- c) Disponibilidad de datos epidemiológicos de cada uno de los aislamientos obtenidos: es importante que haya concordancia epidemiológica entre los aislados investigados y los pulsotipos obtenidos.

La ventajas de la técnica de PFGE serían que tiene una amplia capacidad de aplicación a numerosos microorganismos con el mismo equipamiento y protocolos muy similares, un poder de discriminación muy alto y que además proporciona una concordancia epidemiológica muy adecuada ²¹. Además como ya hemos comentado, realiza un *screening* completo del genoma de la bacteria. Sin embargo no carece de inconvenientes. El primero es que la técnica en su realización y desarrollo es de larga duración (aunque los protocolos estandarizados y optimizados hacen que la duración haya disminuido); además, se requiere un equipamiento y un personal bastante especializado. La capacidad de discriminación de la

técnica no es absoluta, y a pesar de la estandarización, pueden existir variaciones en la interpretación de los resultados entre diferentes laboratorios ¹¹³. Por otra parte, pueden existir cepas refractarias a la digestión por las enzimas de elección para un determinado microorganismo.

El desarrollo de la técnica de PFGE en *Campylobacter* spp. comenzó a principios de los años 90 ⁴³³, como un método de tipificación más discriminatorio que la serotipificación o la fagotipificación, convirtiéndose en el método de referencia en investigaciones de brotes y en estudios epidemiológicos a corto plazo ^{118,349}. Inicialmente la enzima de restricción más utilizada fue *SmaI*, pero esta genera en ocasiones menos de 10 bandas por lo que es necesario utilizar otras con las que obtener mayor información. Se pueden utilizar además, las enzimas *BamHI*, *SalI* o *KpnI* ²⁸¹. Según algunos autores la enzima *KpnI* por si sola sería suficientemente discriminatoria, ya que atribuye con mayor consistencia las cepas al origen de las mismas ²⁵³. Además, permite discriminar dentro de perfiles indistinguibles tras digestión con *SmaI* ^{253,281}. Aún así, se considera que el uso de dos enzimas es esencial en *Campylobacter* para demostrar correctamente las relaciones entre cepas ^{135,224}.

En el año 2001, Ribot y colaboradores desarrollaron un protocolo rápido de tipificación por PFGE para *C. jejuni* ³²⁰ lo que ha permitido una mejor comparación de perfiles entre diferentes laboratorios. Del éxito de la técnica en *Campylobacter* dan cuenta las más de 230 referencias que se obtienen al consultar en la base de datos Pubmed.

De entre las aplicaciones de la técnica de PFGE en *Campylobacter* podemos citar:

- Estudio de brotes de campilobacteriosis: En muchas ocasiones se emplea como única técnica de investigación epidemiológica de forma satisfactoria ^{126,135}, lo cual no es de extrañar, ya que es la técnica considerada de elección en el estudio de brotes. Sin embargo la tendencia actual es utilizar más de una técnica epidemiológica junto con PFGE ^{172,349,355}.
- Epidemiología de *Campylobacter* spp. en granjas avícolas: Se ha utilizado la técnica de PFGE para estudiar las diferentes poblaciones de *Campylobacter* spp. que colonizan las aves, su evolución y el comportamiento (dinámica) de las mismas ^{177,302,326}. También se ha utilizado con frecuencia en estudios de la transmisión horizontal en granjas avícola ^{141,252,301,326,369,439}, como en estudios de la transmisión vertical (transmisión de *Campylobacter* madre-hijo a través del huevo fecundado) ^{45,301}.
- Epidemiología de *Campylobacter* spp. en el hombre: Según algunos autores, PFGE es el primer método de elección para identificar posibles fuentes de transmisión de *Campylobacter* spp. al hombre ²⁴⁷. Para ello se comparan los genotipos de diferentes

orígenes potenciales de *Campylobacter* spp. con aquellos aislados a partir de pacientes humanos. Existen numerosos estudios de este tipo ^{32,88,159,224,236,337}. Aún con las particularidades de cada país, en la mayoría de ellos se determina que hay una mayor semejanza de las cepas de origen clínico con las cepas de origen aviar, frente a las de origen porcino, vacuno, o incluso de animales de compañía o aves migratorias. Todo esto se abordará con más detalle en el apartado de fuentes de infección para el hombre (Apartado 6.3).

En *Campylobacter*, debido a que hay zonas del genoma más susceptibles a los cambios genéticos que otras ²⁸⁶, uno de los inconvenientes principales es la posibilidad de cambios en los perfiles de campo pulsado de forma natural, tras subcultivos de la bacteria ²⁷⁹ o tras pasar por el intestino de un hospedador ¹⁵⁷. Todos aquellos eventos genéticos que producen inestabilidad (transformación, recombinación, presencia de transposones, plásmidos movilizados, fagos lisogénicos, etc...) son fuente potencial de cambios en el pulsotipo de *Campylobacter* spp.³⁴⁹. De hecho, esto se ha comprobado en el estudio de un brote ocurrido en Ontario (Canadá) en el año 2000, donde aparecían diferencias en algunas de las cepas del brote, debido a la variación que provocaba la inserción de un virus bacteriófago ²³. Además, debemos considerar que en *Campylobacter* muchas veces es difícil el aislamiento de una sola cepa en un cultivo, ya que las bacterias tienden a agregarse unas con otras (*swarming*) y es difícil la separación de colonias por siembra en aislamiento ²¹.

4.2.4. MLST (*MultiLocus Sequence Typing*)

MLST (*MultiLocus Sequence Typing*) es una técnica originalmente basada en la técnica de MLEE (*MultiLocus Enzyme Electrophoresis*), la cual está prácticamente en desuso y que estudia la movilidad electroforética de diferentes enzimas y asigna diferentes alelos a las diferentes movilidades que observa ²³⁷. En la técnica de MLEE suelen estudiarse un grupo de 15 a 20 enzimas relacionadas en general con el metabolismo bacteriano. Sin embargo, los resultados obtenidos son difíciles de comparar entre diferentes laboratorios y puede ocurrir que asignemos el mismo alelo a dos enzimas que aún teniendo diferente secuencia de aminoácidos posean la misma movilidad. La técnica de MLST solventa estos inconvenientes ya que se basa en la secuencia de los genes que codifican para dichas enzimas metabólicas. Asigna diferentes tipos (alelos) según las variaciones en la secuencia de los genes estudiados, no según la movilidad de la proteína²³⁷. Las ventajas frente al MLEE son evidentes: conseguimos mayor variación analizando la secuencia que la movilidad electroforética y es posible una comparación objetiva entre diferentes laboratorios vía internet.

Su uso potencial principal es en epidemiología a largo plazo, lo que permitiría determinar la estructura de las poblaciones de un patógeno, el análisis del desequilibrio entre alelos, la búsqueda de mosaicismo y recombinaciones entre alelos ²³⁷. Es por tanto una técnica que se adapta a los objetivos de epidemiología global, ya que identifica variaciones que se acumulan lentamente en genes muy conservados (ya que su función es vital en el metabolismo de la bacteria) dentro de la población bacteriana ⁹⁵. Sin embargo, debemos tener en cuenta que el proceso de selección de los genes no es universal y la técnica debe ser individualizada para cada especie bacteriana, es decir, en cada especie se deben seleccionar los genes que constituirán el esquema de MLST.

El primer desarrollo de la técnica se hizo con *Neisseria meningitidis* ²³⁷ y se observó que con fragmentos de genes de aproximadamente 500 pares de bases de 7 *loci* se conseguía un poder de discriminación igual al de 15 o 20 *loci* en MLEE.

El desarrollo de la técnica en *Campylobacter jejuni* se inició en 2001, por Dingle y colaboradores ⁹⁵. Los genes se escogieron en base a varios criterios: Su localización cromosómica (no deben estar localizados cerca unos de otros), la posibilidad de adaptación al diseño de *primers* específicos y a la diversidad en la secuencia de estos genes, así como la ausencia teórica de selección positiva para cada uno de los *locus*. Además tenía que ser posible amplificar los genes escogidos en cepas procedentes de diferentes orígenes.

Los genes seleccionados para *C. jejuni* fueron *aspA* (aspartasa A), *glnA* (glutamina sintetasa), *gltA* (citrato sintasa), *glyA* (serina hidroximetil transferasa), *pgm* (fosfoglucomutasa), *tkt* (transcetolasa) y *uncA* (gen para la subunidad de la ATP sintasa).

A cada nueva secuencia de cada uno de esos genes se le asigna un nuevo número de alelo, en base a aquellos presentes en la base de datos: <http://pubmlst.org/campylobacter/>. El código de siete dígitos (siete alelos) que forman las secuencias de los siete genes secuenciados se denomina secuenciotipo (ST). Los STs de *C. jejuni* pueden ser agrupados en Complejos Clonales (CC), que podríamos definir como grupos de dos o más cepas que comparten idénticos alelos en cuatro o más de los siete *loci* estudiados ⁹⁵.

Este esquema de genes propuestos se adaptó en 2005 para *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, *C. helveticus* y *C. fetus* ^{256,408}, otras especies causantes de gastroenteritis en humanos. No se introdujeron variaciones en el esquema de genes utilizados en *C. coli* y *C. helveticus*, pero sí modificaciones para las otras dos especies, utilizando los genes *adk* (adenilato kinasa) y *pgi* (glucosa 6-fosfato isomerasa) en vez de los genes *aspA* y *gltA* en el caso de *C. lari* y de *gltA* y *pgm* en *C. upsaliensis*. Las causas de estas variaciones se deben a que los genes sustituidos del esquema original o bien no tenían suficiente variabilidad o no se producía amplificación por

PCR en todas las cepas estudiadas ²⁵⁶. Finalmente, en el año 2007, se desarrolló el sistema de MLST para *C. insulaenigrae* ³⁸⁷, con variación en uno de los genes estudiados (*pgi* por *gltA*).

Entre las aplicaciones del MLST en *C. jejuni* y *C. coli* destacan estudios de tipo poblacional, como serían, sin pretender ser exhaustivos en los ejemplos:

- i) Estudios en cepas aisladas de aves de consumo: se ha utilizado en investigación de la diversidad de cepas de *C. jejuni* y *C. coli* en granjas avícolas ^{141,429}, así como en el estudio de fuentes de colonización en granjas ^{34,166}.
- ii) Estudios de las poblaciones de *Campylobacter* en cepas de origen humano: Ese ha utilizado en la descripción de la diversidad de este patógeno en determinados países y regiones, con búsqueda de clones conservados, o de la asociación de complejos clonales con patologías como el Síndrome de Guillain-Barré, artritis reactivas o gastroenteritis ^{82,100,270}.
- iii) Comparación de cepas de origen humano con cepas aisladas de diferentes animales portadores ^{204,241,247,283}: se intenta probar la asociación de secuenciotipos o complejos clonales con hospedadores animales determinados. Esto ha permitido observar una cierta asociación entre clones de *C. coli* con algunos de los animales hospedadores de esta especie, por ejemplo, la descripción de un “clon bovino” ^{209,255}. Además, se ha observado una frecuente recombinación entre *C. jejuni* y *C. coli* en algunos de los genes utilizados ²⁵⁵.
- iv) Uso de la técnica en investigación de brotes de campilobacteriosis: aunque inicialmente la técnica invita más a un uso en epidemiología global para conocer la estructura de las poblaciones de *Campylobacter* ⁵⁵, se ha utilizado de forma satisfactoria para investigación de brotes ^{55,348,355}. Como en casi todos los estudios de brotes la técnica se apoya en otros marcadores moleculares como SVR-*flaA*, SVR-*flaB* o PFGE. MLST es menos discriminatorio que PFGE, pero su uso combinado con SVR-*flaA* puede dar un resultado igualmente satisfactorio. Además tiene la ventaja de poder analizar cepas que pueden ser refractarias a la digestión por algunas enzimas empleadas en la técnica de PFGE ³⁴⁸. Finalmente, su uso ha permitido la investigación de brotes familiares que pueden pasan desapercibidos en Salud Pública ³³⁶.

5. Campilobacteriosis en el hombre

5.1. Procesos entéricos. Tasas de campilobacteriosis

En general, las enfermedades infecciosas gastrointestinales no son graves por sí solas en los países desarrollados, sin embargo, conllevan una morbilidad y un coste asociado significativo ²⁴⁸. Por ejemplo, se estima que en países como Canadá, el 70% de la población padece algún proceso gastrointestinal al año, con un coste de 120 dolares *per capita* ³⁴¹.

Los procesos gastrointestinales provocados por la infección de especies termofilicas del género *Campylobacter* se caracterizan por una sintomatología, en la mayoría de ocasiones, leve. Los síntomas más comunes son diarrea leve, dolor abdominal y malestar que dura no más de una semana. En ocasiones, los síntomas son más severos, provocando diarrea profusa con presencia de sangre y moco, dolor abdominal fuerte, fiebre, nauseas y vómitos. Por lo general, el periodo de incubación varía entre 1 y 7 días y aunque la mayoría de síntomas se desarrollan 2-4 días tras la infección, la duración puede prolongarse más allá de diez días, requiriendo hospitalización. La dosis infectiva parece influir en la duración del periodo de incubación y del proceso patológico. Tras la infección, se va a producir una multiplicación en el intestino pudiendo eliminar los pacientes de 10^6 a 10^9 ufc/gramo de heces. Son concentraciones similares a las de otras infecciones como en *Salmonella enterica* o *Shigella* spp. ²⁹⁶.

Pese a ser una enfermedad de sintomatología autolimitada, debido al alto número de casos anuales que produce, causa un importante coste económico, tanto en gasto médico como en horas perdidas de trabajo ³²⁸, que en Europa sería de 30 millones de euros al año ⁹⁹.

Es difícil estimar las tasas de mortalidad asociadas a una campilobacteriosis, ya que se han encontrado variaciones entre los datos obtenidos tras infecciones en viajes al extranjero o en el propio país de origen, pero la tasa se encontraría entre 1-3 cada 10000 casos ³⁹⁶. Estas cifras aumentan de forma significativa cuando la infección por *Campylobacter* spp. se produce de forma extraintestinal (3.7%) o cuando hay alguna secuela grave como el Síndrome de Guillain-Barré ²².

Se estima que las campilobacteriosis ocupan el primer lugar entre las gastroenteritis bacterianas en los países desarrollados ^{203,388}. Así, se contabilizan entre 100 y 200 casos por 100000 habitantes en Australia ¹⁵³; 34.9 casos por 100000 habitantes en Canadá ³⁴¹ y de 10 a 30 casos por 100000 habitantes en Estados Unidos de América (en Estados Unidos el principal agente causal de gastroenteritis bacteriana es *Salmonella enterica* ³⁵⁶). En Europa podemos contabilizar 51.6 casos por 100000 habitantes en 2005 y 46.1 casos por 100000

habitantes en 2006, siendo la principal causa de gastroenteritis asociada al consumo de alimentos ³⁰⁶ y manteniéndose como tal en el año 2008 (<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1496.pdf> -página 5- Último acceso 18/1/2012). Desglosando los datos por países, podemos ver, por ejemplo, cifras de 61-76 casos por 100000 habitantes en Finlandia ²⁶³, 42 casos por 100000 habitantes en Islandia ²³⁶, 78-96 casos por 100000 habitantes en Suecia ³⁹⁶ y 123.4 casos por 100000 habitantes en Escocia ²⁹.

En España los datos aportados por el Sistema de Información Microbiológica por parte de diez Comunidades Autónomas, reflejan una mediana de 5890 casos al año en el periodo 2000-2008 (http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-sistema-informacion-microbiologica/bes2000_2008.pdf Último acceso 18/04/2014) y un total de 6173 casos de campilobacteriosis en 2012, con datos aportados de 11 CCAAs (<http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=download&id=10/03/2014-ada00c92a0> Último acceso 18/04/2014).

5.2. Infraestimación de datos

Los casos declarados y registrados de campilobacteriosis en humanos deben ser, claramente, inferiores a las cifras que realmente se deben producir. Debemos tener en cuenta que para que un caso de campilobacteriosis se registre, la sintomatología debe ser severa, acudiendo a un centro médico. El facultativo debe requerir una muestra del paciente, que esta se transporte al laboratorio en las condiciones adecuadas que permitan la supervivencia de las bacterias, siendo *Campylobacter* muy sensible a la duración y a las condiciones del transporte, deben ser capaces de crecer en algún medio de cultivo y ser identificadas correctamente. Finalmente, este resultado positivo debe ser remitido a algún sistema de información o registro sanitario. Son por tanto, muchas condiciones que no siempre se cumplen.

Como hemos apuntado anteriormente, los síntomas de una gastroenteritis producida por *Campylobacter* suelen ser débiles o bien remitir a los pocos días. A diferencia de las infecciones por *Salmonella entérica*, cuya tasa de hospitalización es casi el doble ³⁴¹, los porcentajes de casos que requieren hospitalización varían según los estudios pero podemos estimarlos como bajos, de entre un 5-17% de los casos ^{341,356,388}. De ahí la razón de que no se declaren tantos casos como los que probablemente se producen en realidad.

En España, los datos registrados para el periodo 2000-2008 proceden del Sistema de Información Microbiológica, de 41 laboratorios de microbiología clínica de 10 CCAAs, pero sólo 30 laboratorios notificaron de manera constante en el periodo 2000-2008. En el 2012, once CCAAs comunicaron datos de casos de campilobacteriosis con notificación de 61

laboratorios. Por tanto no se conocen los datos en muchas zonas del país, siendo los datos reales desconocidos.

Se ha intentado cuantificar por diferentes estudios cuál sería el porcentaje real de campilobacteriosis. Así, en una investigación llevada a cabo en Canadá ⁴⁰⁰, se estimó que por cada caso confirmado, acontecerían de 23 a 49 casos más no declarados. Otros estudios rebajan esas cifras hasta un 49% más de los realmente declarados ³²⁵, o hasta incluso diez veces más de los declarados ¹¹.

5.3. Fuentes de infección de *C. jejuni* y *C. coli* para el hombre

Por campilobacteriosis nos vamos a referir en este apartado a aquellas gastroenteritis provocadas por las especies *C. jejuni* y *C. coli*, ya que las fuentes de infección y formas de transmisión de otras especies minoritarias son desconocidas en la mayoría de casos.

La epidemiología de las campilobacteriosis en el hombre es compleja, con diferentes fuentes y rutas potenciales de infección, alguna de ellas no comprendida en su totalidad ³⁷². Las dificultades en la atribución del origen de la infección se deben principalmente a dos causas: i) existen numerosas fuentes potenciales de *Campylobacter*, puesto que puede colonizar el intestino de una gran variedad de animales y ii) el hombre parece desarrollar una cierta inmunidad frente a este patógeno ³⁸⁸. Este último hecho parece confirmarse por la baja incidencia de campilobacteriosis entre trabajadores de granjas avícolas en las que la prevalencia de *Campylobacter* spp. en las aves con las que trabajan es muy alta ³¹⁴. Identificar de forma correcta las fuentes de infección nos puede permitir combatir los reservorios de estas bacterias y así disminuir la principal causa de gastroenteritis bacteriana en los países desarrollados.

Diferentes estudios epidemiológicos han apuntado un carácter estacional de la infección (picos de campilobacteriosis en los meses de verano) y una relación con algunos grupos de edad. Algunas posibles claves que explicarían esto pueden ser la expansión en verano de insectos vectores (moscas domésticas), patrones de consumo de alimentos, uso de aguas recreativas sin tratamiento (lagos, ríos...), y hábitos de higiene en niños pequeños (contacto con animales) ^{15,97}.

Podemos destacar como principales fuentes de infección para el hombre:

Carne de pollo: Sin lugar a dudas, la infección por *C. jejuni* o *C. coli* se adquiere principalmente a través de la cadena alimentaria ⁴²⁷. Ambas especies, *C. jejuni* y en menor medida *C. coli*, son comensales habituales en el intestino de diferentes aves de

consumo incluyendo pollo, pato, avestruz, pavo, etc ^{69,297,363}. Dentro de estos posibles alimentos, la carne de pollo es la principal fuente de infección en el hombre. Se estima que directa o indirectamente podría causar hasta un 40% de los casos ⁴¹³, mientras que otros autores elevan esta cifra hasta un 50-80% de los casos ³⁸⁸. Se ha llegado a estas conclusiones de forma directa e indirecta. Una evidencia indirecta pero muy interesante se obtuvo durante la denominada “Crisis de las dioxinas” en Bélgica, en el año 1999. Debido a la contaminación de piensos para aves con dioxinas, se prohibió la venta de carne de pollo y huevos producidos en Bélgica (aproximadamente la mitad de la carne de pollo y huevos en el mercado belga) durante junio de ese año. Durante ese mes se produjo un descenso en los casos de campilobacteriosis en un 40% ⁴¹³. Las evidencias directas se basan en la comparación de genotipos de cepas de origen humano con aquellas cepas procedentes de diferentes animales reservorio, alimentos y medio ambiente. En la mayoría de estudios de este tipo hay una asociación entre cepas de origen humano con aquellas procedentes de carne de origen aviar o vacuno. Así, podemos encontrar en varios estudios los mismos perfiles de PFGE o muy similares entre cepas de pollo y de humanos ^{44,88,159,236}. Mediante la técnica de MLST se ha encontrado también complejos clonales que eran exclusivos de hombre y pollo, sin aparecer en otros posibles hospedadores o fuentes abióticas de infección ^{218,236,365,427}.

El tracto intestinal de las aves es un hábitat idóneo para *C. jejuni* y *C. coli*, sobre todo la mucosa de las criptas del ciego e intestino grueso, cerca de la superficie de las células epiteliales. En ellas la concentración de oxígeno presente es baja, sin llegar a un ambiente anaerobio (donde *Campylobacter* no podría desarrollarse), pero sí con niveles de oxígeno de microaerobiosis ²¹⁴.

Otro factor que hace del intestino de las aves un nicho ecológico ideal es la temperatura corporal de las aves (42° C), que es óptima para el desarrollo de la bacteria ³⁷⁸. Recientemente se ha observado que cuando *C. jejuni* varía en las condiciones de cultivo de 42° C a 37° C aumenta de forma significativa el fenómeno de quimiotaxis, incrementándose la movilidad de la bacteria ²⁰⁰. La quimiotaxis es un factor relacionado con la virulencia. Por tanto, la variación de temperatura corporal entre hospedadores explicaría la causa de que no se produzca infección en el ave y sí en el hombre (aunque no explicaría la presencia de la bacteria de forma asintomática en otros hospedadores como cerdos, vacas, ovejas, etc.). Se apunta a variaciones en componentes del mucus intestinal de las aves o a variaciones en el pH (en las aves es más ácido) como factores que potencialmente afectarían a la virulencia de las cepas ³⁹.

La presencia de diferentes especies del género *Clostridium* spp. y *Bacteroides* spp. colonizando el intestino de las aves también favorece la presencia de *C. jejuni/coli* en pollo. Ambas son especies proteo y sacarolíticas, que generan una gran cantidad de metabolitos que aprovecha *Campylobacter* spp. para su metabolismo (aminoácidos e intermediarios del Ciclo de Krebs) ²¹⁴. Además, éstas y otras bacterias en su metabolismo fermentativo en el intestino de las aves producen hidrógeno, que como hemos apuntado previamente, favorece el crecimiento de *Campylobacter*. Esta idoneidad se refleja en el número de bacterias de *Campylobacter* que pueden recuperarse por gramo de contenido intestinal en aves que es de hasta 10⁹ ufc ⁵⁴.

Pero pese al primordial papel de la carne de pollo en las campilobacteriosis, quedan muchos casos en los que no podemos atribuir un origen claro de las mismas. Se apuntan a otras fuentes que pueden ayudar a comprender la complejidad de la epidemiología de la enfermedad:

- Carne de cerdo: *C. coli* es la principal especie del género que aparece como comensal habitual del tejido intestinal del cerdo, siendo aislada con una alta frecuencia ¹⁷⁹, mientras que en ganado vacuno y en aves de consumo como el pollo se aísla en general en mucha menor cantidad (1-6% en ganado vacuno y un 11% en pollo) ^{268,425}. Pese a ello, todos los estudios genotípicos realizados estiman que la carne de cerdo no es una fuente de infección relevante para el hombre ^{88,241}.
- Animales domésticos: Se estima que los animales domésticos como perros y gatos pueden ser portadores asintomáticos de *Campylobacter* spp. ¹²⁴. Por lo general las especies que se aíslan con más frecuencia en perros y gatos son *C. upsaliensis* y *C. helveticus*, respectivamente ³³⁵, aunque en segundo lugar aparece en muchos casos *C. jejuni* tanto en gatos y perros con síntomas de diarrea como en sanos ^{3,49}, por lo que potencialmente pueden ser una fuente de infección para el hombre.
- Agua de consumo o de recreo: El carácter estacional de las campilobacteriosis recuerda al comportamiento de otros patógenos como *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp., cuya fuente de infección principal es el agua ^{376,427}. Por tanto, probablemente, el agua es un vehículo de las campilobacteriosis no suficientemente evaluado. La contaminación de las aguas sería de tipo fecal, bien por animales de abasto o por aves silvestres ¹⁵, aunque un estudio llevado a cabo en 2004 determinó que apenas se encontraban genotipos similares entre cepas de aves silvestres con cepas de humanos ³².
- Ganado vacuno, leche sin pasteurizar: Respecto a la contaminación por heces de ganado vacuno, bien en matadero o bien contaminando otros alimentos (verduras, por riego con aguas contaminadas con heces de ganado vacuno), la mayoría de estudios de

comparación de genotipos encuentran que hay una asociación entre cepas de ganado vacuno con cepas aisladas en humanos ^{148,236,365}. Incluso en algunos países como Finlandia, donde la prevalencia de *C. jejuni* en granjas avícolas es muy baja, se considera que el ganado vacuno tiene la misma importancia que las aves de consumo como reservorio de *C. jejuni* para la población ⁸³. La leche de vaca sin pasteurizar, aunque su consumo no sea frecuente, sí se ha asociado a brotes de campilobacteriosis.

- Frutas y verduras: Pese a que en algunos estudios aparecen como el segundo factor de riesgo después del consumo y preparación de carne de pollo, se han mostrado como portadoras de *Campylobacter* spp. en un bajísimo porcentaje (0.23 %) ⁴¹⁴. Sin embargo, su riesgo estaría en que pueden ser fuente de infección por contaminaciones cruzadas con otros alimentos contaminados.
- Insectos: Las moscas (generalmente la especie *Musca domestica*) son vectores mecánicos y biológicos (mediante sus deyecciones) de bacterias patógenas como *Salmonella* Typhi, *Shigella* spp., *Escherichia coli*, entre otras ⁶⁸. Existen datos epidemiológicos que apuntan a que también pueden ser un vector importante en las campilobacteriosis ¹⁰⁵. Algunos de estos factores serían: i) La dosis infectiva de *Campylobacter* es similar a la de otros patógenos transmitidos por moscas, pudiendo sobrevivir en el cuerpo y heces de las mismas hasta siete días. ii) Aunque un bajo porcentaje de moscas capturadas en los alrededores de granjas avícolas portan *Campylobacter* (2.4-8 %) son insectos que pueden tener numerosos contactos con alimentos o personas iii) Es un vehículo reconocido de *Shigella* spp., y este patógeno está en menor número y menos distribuido que *Campylobacter*, por lo que no debería ser extraño que también actúe como vector de *Campylobacter*. iv) La presentación como casos esporádicos más que en brotes familiares, los cuales deberían ser más frecuentes si los alimentos contaminados fueran la principal causa y, v) La estacionalidad, con picos en verano, cuando hay una mayor población de moscas ¹⁰⁵.

5.4. Brotes de campilobacteriosis

Campylobacter spp. es incapaz de multiplicarse en los alimentos que contamina, y en el hombre tiene un periodo de incubación variable. Debido a estas causas, se estima que los brotes de campilobacteriosis son poco frecuentes y cuando se producen suelen implicar un menor número de casos que otros patógenos alimentarios como *Salmonella enterica* ⁹⁷. De este modo se estima que de un 3 a un 5 % de las campilobacteriosis corresponden a brotes ¹¹⁰, mientras que se cree que puede haber bastantes más brotes sin identificar, en muchos casos ligados a un ámbito doméstico ³³⁶, en los cuales la transmisión persona a persona jugaría un papel importante ⁹⁷.

De forma clásica, los brotes en *Campylobacter* se asocian al consumo de agua sin potabilizar o a leche, bien sin pasteurizar o deficientemente tratada ¹²². En aquellos brotes ligados al consumo de agua contaminada, los brotes adquieren un mayor número de afectados ³⁰⁶. Así, se informaron de hasta 442 casos en una localidad finlandesa durante el mes de agosto de 1998 ²⁰⁷, 105 casos en Noruega ¹⁸⁴, 71 casos en Japón ² o ya con un menor número de casos, 15 personas en un brote en Gales ³²². En todos ellos, la presencia de la bacteria en agua se asociaba bien a que el agua no estaba clorada o bien a un fallo o rotura en el sistema de conducción o almacenamiento del agua.

Los brotes asociados al consumo de leche son mucho menos numerosos. Esto es hasta cierto punto lógico, ya que el consumo de leche sin pasteurizar debería ser muy poco habitual en los países desarrollados. De hecho, en la mayoría de brotes reflejados en la literatura científica, el consumo de leche se debe a visitas a granjas o ferias agrícolas, etc ^{172,303}. Como dato anecdótico, el primer brote de campilobacteriosis que aparece en la literatura científica se debió al consumo de leche en mal estado por parte de los reclusos de dos penitenciarías en EEUU en 1938 ²²⁰.

Los brotes debidos al consumo de carne de pollo también se producen, aunque en la literatura científica solamente suelen aparecer reflejados aquellos en los que ha habido un alto número de afectados. Pueden ser por consumo directo de la carne ^{245,435} o por contaminaciones cruzadas con otros alimentos ¹⁸⁹. Incluso se ha documentado algún caso de brote en el que interviene un manipulador de alimentos que actúa de portador ²⁷⁸.

A las dos fuentes clásicas de brotes de campilobacteriosis (leche sin pasteurizar y agua no potabilizada) debemos añadir los patés elaborados a partir de hígado de pollo. En un estudio en Gran Bretaña, se estableció que el 38 % de los brotes de campilobacteriosis provenían por el consumo de estos preparados, frente a un 13% asociado al agua y un 7% al consumo de leche sin tratar ²²⁷. La explicación es que el hígado puede ser colonizado por *C. jejuni* o *C. coli* o bien contaminarse en la evisceración y preparado del paté. El contenido graso del alimento protegería a la bacteria del pH ácido del estómago.

En España, según datos del Boletín Epidemiológico Semanal (<http://www.isciii.es/htdocs/pdf/Informedebrotesalimentarios.pdf>) durante el periodo 1994-2003 se contabilizaron 36 brotes de campilobacteriosis a través del consumo de alimentos. Es una cifra muy baja si lo comparamos con los 56 brotes por *Bacillus cereus*, los 301 provocados por *Staphylococcus aureus* y muy lejos de los causados por *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis (2568 brotes). Al hecho de que quizás los brotes sean, objetivamente, menores en número que los de otros patógenos, como reflejan algunos autores ¹²², habría que añadir que la

investigación estaría complicada por las propias características de la infección: Periodo de incubación variable entre los afectados por la misma cepa, bajo número de afectados, sintomatología variable, dificultad en el aislamiento, etc.

6. Estudios poblacionales de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en granjas avícolas

La epidemiología de las campilobacteriosis en el hombre no es totalmente conocida y aunque como hemos visto deben existir diferentes fuentes de infección para el hombre, en esta zoonosis el consumo o manipulación de carne de pollo sigue siendo el principal factor para contraer la infección. Por tanto, se hace necesario como un objetivo imprescindible en Salud Pública obtener canales de pollo libres de *Campylobacter* spp. en el mercado. Las medidas aplicadas con éxito para prevenir la presencia de *Salmonella* en los lotes de aves dentro de las granjas se muestran generalmente poco eficaces para *Campylobacter*, lo que refleja las diferencias en la fisiología, ecología y en la epidemiología entre ambos microorganismos ²⁶⁶. Necesitamos, por tanto, conocer las prevalencias de *Campylobacter* en las granjas de pollos, el comportamiento de las poblaciones bacterianas, las fuentes de infección, etc, para controlar o impedir la colonización de aves de consumo por parte de esta bacteria.

6.1. Prevalencia de *Campylobacter* en granjas avícolas

Se estima que aproximadamente el 58% de la carne de pollo presente en el mercado, a nivel mundial, estaría contaminada con *Campylobacter*. De forma similar, un 60.3 % de los productos derivados de pollo también estarían contaminados por esta bacteria ³⁹⁰. Aunque como podemos ver en la tabla 2, los niveles de prevalencia de *Campylobacter* spp. en carne de pollo en diferentes países son variables.

Está generalmente aceptado que una forma eficaz de evitar la contaminación de la carne de pollo debería ser actuar antes del matadero. Es decir, que los lotes de aves a sacrificar lleguen libres de *Campylobacter* spp. Es muy importante la limpieza de las instalaciones del matadero, ya que con el faenado de lotes previos de aves colonizadas por la bacteria, se puede producir contaminación de agua, equipos, etc., por lo que los lotes libres pueden contaminarse con *Campylobacter* ⁴³⁹. Aún cuando se considera que *Campylobacter* es una bacteria poco resistente a las condiciones ambientales, se ha observado cómo tras una desinfección de las instalaciones e instrumental del matadero tras el paso de un lote infectado, hasta un 21% de las muestras ambientales que se recogen continúan siendo positivas a *Campylobacter* spp. ¹⁹¹.

País	Prevalencia de <i>Campylobacter</i> spp. en carne de pollo
Australia	100%
República Checa	100%
Argentina	92.9%
Nueva Zelanda	89.1 %
Turquía	83.5%
Senegal	82%
Italia	80%
Bulgaria	76.3 %
USA	71.5%
Tailandia	65.1%
España	59.3 %
Francia	58.8%
Japón	58.8%
Irlanda	51.1%
Alemania	45.6%
Sudáfrica	39.4%
Suiza	25.1%
Estonia	8.1%

Tabla 2. Datos de prevalencia de *Campylobacter* spp. en carne de pollo, tomado de Suzuki y colaboradores ³⁹⁰

Antes de tomar cualquier medida para erradicar *Campylobacter* spp. de la cadena alimentaria, se hace imprescindible conocer la prevalencia de *Campylobacter* spp. en los lotes de pollos destinados a matadero. Debemos diferenciar dos tipos de prevalencias, una sería la prevalencia de lotes positivos a *Campylobacter*, es decir, de los lotes de pollos estudiados, cuántos tienen alguna muestra positiva a *Campylobacter*. Otro dato importante es, cuántos animales dentro de un lote son positivos a *Campylobacter* porque a menor número de aves colonizadas, menos probabilidad hay que todo el lote termine contaminado en matadero. Aunque, como hemos visto, por contaminación cruzada es bastante probable que la bacteria se disemine, contaminando toda la producción de carne.

Los pollos destinados para consumo de carne son los denominados “broilers”, con una edad de sacrificio que en España es de 45 días (los pollos para asar son de menor edad, de entre 4-5 semanas, tras un proceso que se denomina “aclorado”, explicado en el punto 7.4.2.2). Las

prevalencias en granjas de *broilers* son muy variables en diferentes países. Los factores geográficos deben de tener una importancia en la prevalencia, sobre todo el clima. En los países escandinavos y nórdicos, la prevalencia es baja y suele oscilar entre el 10-30%, mientras que en los países europeos más meridionales o centro europeos oscila entre un 30 y un 90%. La influencia del clima se observa en la estacionalidad de los datos, con picos en verano. Las temperaturas altas afectarían a posibles fuentes de infección en la granja (aumento de insectos y roedores, aumento del consumo de agua, etc..) posibilitando su entrada en las mismas (aumenta la ventilación de las mismas) ²⁸⁹.

Pero se cree que los factores que más influyen en la prevalencia son los relacionados con aspectos zootécnicos: manejo de las aves, bioseguridad de las granjas, salud de los animales, sistemas de producción, etc.. ^{194,214}.

Datos de la Unión Europea indican prevalencias durante el año 2006 por países que confirman las variaciones geográficas (<http://www.efsa.europa.eu/fr/scdocs/doc/1503.pdf>). Como vemos en la tabla 3, la prevalencia en número de lotes de *broilers* con aves colonizadas en el 2006 varió entre un 2 y casi un 100% de los lotes. En muchas ocasiones, la comparación de datos de prevalencia entre países e incluso dentro de un mismo país es muy difícil. La variación de datos puede deberse a que a veces no se sigue un muestreo estandarizado, o incluso a que el transporte de las muestras, los métodos de la detección o la comunicación de los datos tampoco estén estandarizados ²¹⁴. No ocurre así en el caso reflejado en la tabla 3, donde todos los países siguieron la misma metodología de toma de muestras e identificación, siendo la única diferencia las edades de sacrificio de los animales, que varían por países.

En muchos casos, la mejora de la bioseguridad en las granjas ha conseguido reducir la prevalencia. Así, por ejemplo, en Holanda se pasó de un 50% de lotes colonizados en 1997 a un 40% en el 2000 ⁴⁰⁶ o en Dinamarca de un 52 % en el año 2000 a un 37% en el 2001 ^{152,171}.

Un factor que influye en gran medida en la prevalencia de *Campylobacter* spp. en granjas es la edad de las aves cuando se lleva a cabo el muestreo. Así, en un estudio llevado a cabo en Noruega se determinó que en gallinas ponedoras de 76 semanas (prácticamente el final de su vida productiva), la prevalencia llegaba a ser del 73%, mientras que en *broilers* de 32-35 días, la prevalencia era de un 7% ¹⁹¹.

Debemos considerar que cuando un ave adquiere la bacteria, permanece colonizada hasta su sacrificio ³⁴⁷, esto le permite a su vez, dispersar la bacteria con sus deyecciones durante mucho tiempo, contaminando el ambiente de la granja. Además, generalmente, cuando un lote inicia la infección, en relativamente poco tiempo ésta se propaga afectando a

prácticamente todos los animales de esa granja ⁴⁰⁶. Esto se debe no solo a la contaminación del agua del bebida o del pienso, sino a los hábitos coprofágicos de las aves de corral ²⁶⁶. Generalmente, aquellos lotes con mayor densidad de población de aves son los que tienen mayores tasas de colonización por parte de *Campylobacter* spp. Así, se justifica la baja prevalencia de lotes positivos en países como Noruega no solo por las condiciones climáticas, sino también porque suelen ser granjas de pequeño tamaño, modernas, con bajo número de aves ¹⁹⁰.

País	Prevalencia de lotes de broilers positivos a <i>Campylobacter</i> spp.	Prevalencia de canales de broilers positivos a <i>Campylobacter</i> spp.
Malta	96.8%	94.3%
España	88%	92.6%
Irlanda	83.1%	98.3%
Portugal	82 %	—
Eslovenia	78.2 %	77.8%
Francia	76.1 %	88.7%
Reino Unido	75.3 %	86.3%
Italia	63.3 %	49.6%
Hungría	50.1%	55.3%
Alemania	48.9%	60.8%
Austria	47.8 %	80.6%
Lituania	41.5%	45.8%
Letonia	41%	33.6%
Bélgica	31%	52.7%
Holanda	24.4%	37.6%
Dinamarca	19%	31.4%
Finlandia	3.9%	5.5%
Estonia	2%	4.9%

Tabla 3. Datos de prevalencia de *Campylobacter* spp. en países europeos en el año 2006, publicados en 2008, tomados del informe de la EFSA: <http://www.efsa.europa.eu/fr/scdocs/doc/1503.pdf>

6.2. Especies del género *Campylobacter* aisladas en granjas

Como ya hemos visto, las especies principales que colonizan el intestino de las aves son *Campylobacter jejuni* y *C. coli* ²¹⁴. La especie *C. lari* también puede colonizar el tracto digestivo de las aves de corral, aunque se aísla en porcentajes muy bajos, de entre un 0.6-6.4% ^{191,425}. La colonización por *C. lari* va a depender en gran medida de la presencia de aves marinas cerca de granjas con bajas medidas de bioseguridad. En el año 2009 se describió una nueva especie hipurato positiva, como *C. jejuni*, denominada *Campylobacter avium*, en muestras cloacales de pollo, aunque se desconoce la epidemiología y prevalencias de esta especie ³³⁴. Al ser *C. avium* hipurato positivo podría ser confundida con *C. jejuni*, por tanto es imprescindible identificar correctamente las especies aisladas. Incluso puede haber especies de géneros afines como *Helicobacter* (principalmente *H. pullorum*), cuyas pruebas bioquímicas de identificación y morfología microscópica son muy similares a las de *Campylobacter* ⁴²⁹. Así, en un estudio llevado a cabo en Irlanda, se han encontrado porcentajes considerables de muestras positivas a *Helicobacter* spp. (hasta un 3.5%) ²⁸⁸.

Los porcentajes en los que aíslan *C. jejuni* y *C. coli* aunque variables, siempre denotan que la especie principal es *C. jejuni* (entre un 57 y un 90%), mientras que *C. coli* aparece en valores minoritarios, entre un 10-30%. Aunque al igual que en el caso de *C. lari*, el porcentaje de cada especie va a depender de la fuente de infección de la granja. Podemos ver los datos con más detalle en la tabla 4.

País	Porcentaje de <i>C. jejuni</i>	Porcentaje de <i>C. coli</i>	Referencia
Irlanda	57%	36.6%	Patriarchi <i>et al</i> 2011 ²⁸⁸
Alemania	73.6%	23.7%	Alter <i>et al</i> 2011 ⁸
Inglaterra	80.6%	19.4%	Colles <i>et al</i> 2010 ⁵⁹
Suiza	83%	17%	Wittwer <i>et al</i> 2005 ⁴³⁰
Dinamarca	86%	11%	Wedderkopp <i>et al</i> 2000 ⁴²⁵
Finlandia	94%	6%	Perko-Makela <i>et al</i> 2002 ²⁹⁸
Suiza*	66.7%	33.3%	Wirz <i>et al</i> 2010 ⁴²⁹
Noruega	76.1%	18.3%	Johnsen <i>et al</i> 2007 ¹⁹¹
Francia	61.4%	38.6%	Denis <i>et al</i> 2008 ⁸⁹

Tabla 4. Porcentajes de *C. jejuni* y *C. coli* identificados en granjas avícolas de diferentes países europeos. *Estudio llevado a cabo en Suiza 5 años después del realizado por Wittwer en 2005 con porcentajes variables.

6.3. Edad de las aves y colonización por *Campylobacter* spp.

Generalmente, en las condiciones normales de producción de *broilers*, no se detecta colonización por *C. jejuni* antes de las 2-3 semanas de vida del animal ^{53,368}. Alrededor de esta 2^a-3^a semana de vida comienza a detectarse la presencia de la bacteria, aumentando el número de animales colonizados hasta alcanzar un máximo a las 6-7 semanas de vida, que generalmente coincide con la edad de sacrificio de los animales ⁶⁵, lo cual es de importancia en Salud Pública. Posteriormente, algún estudio en aves reproductoras constata que hacia el final de la vida productiva del ave la prevalencia disminuye, quizás por cambios en la microbiota del intestino, o cambios en la alimentación o en los hábitos alimenticios⁵⁸.

Los mecanismos de resistencia a la colonización en las primeras semanas de vida del ave no han sido totalmente definidos, pero todo parece indicar que los anticuerpos maternos ejercerían un factor protector tanto frente a bacterias homólogas como heterólogas (es decir, tanto frente a bacterias con los determinantes antigénicos que inducen esos anticuerpos como a bacterias que no poseen esos mismos antígenos) ³⁴⁶. La principal inmunoglobulina implicada es la IgG y en menor medida la IgA. Tras el nacimiento, los pollitos poseen unos niveles de IgG circulantes muy altos, pero estos no aparecen en el tejido intestinal hasta la primera semana. Ese desfase temporal es el tiempo que tarda la IgG en pasar de sangre a tejido intestinal; a diferencia de la IgA que se secreta directamente en tejido intestinal. Los niveles de IgG materna caen sustancialmente a los 14 días y durante la 3^a-4^a semana quedan en sangre en niveles basales muy bajos³⁴⁶.

Pese a este periodo refractario tras el nacimiento en que no hay colonización, algún estudio ha encontrado una alta susceptibilidad a la bacteria durante los tres primeros días de vida ⁵³. El retraso en el paso de la IgG materna de sangre a tejido intestinal y la inmadurez del sistema inmune del pollo y una dosis infectiva muy alta explicaría, tal vez, la mayor susceptibilidad en estos primeros días de vida.

6.4. Fuentes de colonización de *Campylobacter* en granjas avícolas

Diferentes autores estiman que dada la dificultad de eliminar la bacteria de las plantas de procesamiento de carne y mataderos, se debe actuar en la reducción la presencia de *Campylobacter* en los lotes de aves, y así conseguir controlar la contaminación en toda la cadena de producción ^{160,323}. La reducción de la presencia de la bacteria en la cadena alimentaria comenzaría, por tanto a través de medidas preventivas, actuando en la producción primaria.

Antes de llevar a cabo un programa de control de *Campylobacter* spp. en granjas de aves es imprescindible identificar las fuentes y rutas de contaminación en los lotes de aves. A pesar de extensas investigaciones, las fuentes de colonización y rutas de transmisión de *C. jejuni* y *C. coli* en granjas avícolas tienen que ser aún totalmente elucidadas ²⁷⁴.

Los factores de riesgo para la entrada de *Campylobacter* en las granjas pueden variar significativamente de unos países a otros e incluso de unas granjas a otras, en gran medida según condiciones de bioseguridad, climáticas y de manejo ²⁷⁴ (<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1522.htm> último acceso: 28/1/2013). Por tanto, es difícil definir las fuentes de colonización de una forma general, teniendo que investigarse de forma más o menos individualizada según las características de la granja.

Existen dos formas potenciales de colonización, bien a través del huevo fecundado, donde la madre transmitiría la bacteria a la progenie (transmisión vertical) o bien adquirir la bacteria a través de fómites (transmisión horizontal).

6.4.1. Transmisión vertical

La transmisión vertical es la transmisión de un patógeno por vía materna a la descendencia durante el desarrollo de ésta. En el caso de las aves, las bacterias accederían a la progenie a través del huevo fecundado. Esta forma de transmisión en aves de corral es conocida para algunas especies bacterianas, como los serotipos Enteritidis y Pullorum en *Salmonella enterica* ²⁷⁷ o la especie *Enterococcus faecalis* ¹¹⁶.

Determinar si *Campylobacter* es capaz de transmitirse de esta forma supone abordar la eliminación de la bacteria de la cadena alimentaria de forma muy diferente a si solamente accede a las granjas por medio de transmisión horizontal. Seleccionando aquellos huevos fecundados procedentes de aves libres de *Campylobacter* se podría conseguir una reducción muy importante del número de aves colonizadas en las granjas.

En las aves de corral es posible detectar *C. jejuni* y *C. coli* en diferentes órganos del sistema reproductor, tanto en machos como hembras. En ambos casos, el sistema reproductor y el digestivo (así como el excretor) comparten una estructura común, la cloaca. Por contaminación retrógrada, las bacterias pueden ascender y colonizar zonas del sistema reproductor desde la cloaca. En las hembras, es posible aislar *Campylobacter* de oviducto y folículos ováricos ^{33,45} (26% de folículos ováricos maduros y de un 12% de folículos ováricos inmaduros ⁶⁶). En machos también es posible aislarlo de semen en un alto número de bacterias por mililitro ⁶⁷, pudiendo acceder de esta forma en gran número al folículo ovárico. Una vez que accede al interior del huevo fecundado de una u otra forma se estima que

Campylobacter puede sobrevivir en el interior del huevo los 21 días de incubación hasta en un 80% de huevos contaminados ¹¹⁹.

Otra posibilidad es que la bacteria atraviese la cáscara durante el desarrollo de la misma y en la puesta. Aunque para ello debe competir con el resto de microflora presente en alto número en heces (*Clostridium* spp., *Enterococcus* spp., etc.). A favor de esta idea de penetración en la cáscara está el hecho de que se ha podido aislar *Campylobacter* tanto de la superficie interior de la misma como del contenido del huevo, después de ser aislado de la superficie externa manchada y de las propias heces del ave ³⁶². Aunque debemos tener en cuenta que en la industria avícola, tras la puesta de huevos fecundados y de forma previa a la incubación, tienen procesos de higienización, por lo que contaminación en las incubadoras una vez se ha constituido la cáscara parecería poco probable ⁴³.

Existen varios estudios que sugieren la transmisión vertical de *Campylobacter* en aves de consumo, aunque la mayoría de ellos se basan en evidencias indirectas, como el aislamiento de la bacteria en restos de cáscara y plumón tras la eclosión de huevos en incubadora y en las propias incubadoras ^{38,173}. También se ha conseguido aislamiento de ADN de *Campylobacter* en muestras tomadas de pollitos recién nacidos o en embriones de pollo ^{75,76}, aunque nunca crecimiento bacteriano a partir de muestras de pollitos recién nacidos ³⁴⁵. Otros autores sugieren que la ausencia de diversidad de genotipos y la intermitencia en la alta positividad encontrada en sus granjas de estudio indicarían que la colonización se llevaría a cabo por transmisión vertical más que por contaminaciones durante el transporte o en la incubación ²⁹⁴. Solamente en el estudio de Cox y colaboradores en el 2002 ⁶⁷ se encontraron ribotipos y alelos de SVR-*flaA* idénticos en reproductores y en el lote de *broilers* descendiente que se obtenía.

Pese a estas evidencias indirectas, la mayoría de estudios sugieren que la transmisión vertical o bien no existe o bien es poco probable. Estudios realizados durante diez años nunca consiguieron aislar *Campylobacter* en ningún pollito de 1 día procedente de aves positivas a *Campylobacter* pero criado en un ambiente libre de *Campylobacter* ²⁶⁶. En el 2006, Callicott y colaboradores encontraron que en un sistema de producción fácilmente trazable, como es el islandés, donde todos los huevos fértiles proceden de otro país (Suecia) en ningún caso aparecían aves positivas antes de las 6-8 semanas (hasta que las aves no llegaban a granjas con medidas de bioseguridad menos estrictas) ⁴³. Pero en general, los estudios que rechazan la idea de la transmisión vertical se basan en que no se aíslan los mismos genotipos en las cepas aisladas en los reproductores y en los *broilers* descendientes ^{274,301}.

6.4.2. Transmisión horizontal. Fuentes bióticas y abióticas

En los estudios de factores de riesgo de colonización por *Campylobacter* en granjas de aves, la transmisión vertical está entre las cinco menos probables ⁵. Por tanto, probablemente, el origen de la bacteria debe ser alguna fuente externa a la propia ave, mediante una transmisión de tipo horizontal. La dificultad de determinar el origen se debe a: ubicuidad de *Campylobacter* en el ambiente de la granja, débil clonalidad en la estructura de las poblaciones y baja tasa de recuperación en el ambiente ³²⁴.

La transmisión de *Campylobacter* en granjas posee dos características: 1) se produce muy rápidamente dentro del lote de aves y 2) es muy difícil de controlar ³⁷¹. Estas dos características apoyan que la transmisión horizontal sea la fuente más probable. Por tanto, teóricamente, mediante medidas de bioseguridad en las granjas se conseguiría evitar la colonización de los lotes de aves.

6.4.2.1. Insectos

Los insectos pueden ser vectores de diferentes patógenos, tanto virus, bacterias como parásitos. En el caso de bacterias, son vectores conocidos de *Salmonella enterica*, *Yersinia* spp., *E. coli*, *Shigella* spp., *Klebsiella* spp. y *Staphylococcus* spp., entre otras especies ¹⁴⁵. La actuación como vectores puede ser tanto en la superficie como en el interior de los mismos ²⁶⁶.

En el entorno de las granjas avícolas hay distintas especies de insectos asociados, como moscas (*Musca domestica*, *Stomoxys calcitrans*) y coleópteros (*Alphitobius diaperinus*, *Carcinops pumilio*) así como las larvas de estos insectos ³¹⁹.

A pesar de las medidas de control, la presencia de moscas es frecuente en las granjas avícolas, siendo la principal especie *Musca domestica*. En diferentes estudios se asocia la presencia de insectos con un mayor riesgo de colonización por *Campylobacter* en broilers. Cuando se encuentran otras instalaciones de ganado vacuno, porcino, etc., en las cercanías de las granjas avícolas, las moscas pueden actuar como vectores de esta bacteria. Esto es posible comprobarlo observando las diferencias en prevalencia de *Campylobacter* en las moscas que se capturan en el ambiente exterior de las granjas. Así, hasta un 10% de las moscas pueden portar *Campylobacter* cuando hay otras granjas de animales cercanas, mientras que esas cifras son solo de un 1% de portadoras si no hay otras instalaciones animales cercanas ^{150,160}. Cuando se han llevado a cabo programas de control de moscas en granjas de broilers, se ha obtenido un significativo descenso en la prevalencia de *C. jejuni* en granjas, de un 51.4% a un 15.4 % evidenciando la influencia de estos insectos como vectores ¹⁵¹.

Aún así, la prevalencia de la bacteria en las moscas es baja (1-10 %), pero el alto número de insectos hace que sea un factor de riesgo a considerar ^{150,160}. Al igual que en la epidemiología de las campilobacteriosis en el hombre ¹⁰⁵, las poblaciones de moscas podrían explicar las variaciones estacionales en la prevalencia de *Campylobacter* spp. en granjas avícolas en muchos países ¹⁵¹.

Otro insecto muy abundante en las granjas avícolas son las larvas y adultos de los denominados escarabajos oscuros o alfitobios (*Alphitobius diaperinus*) ¹⁶⁸ los cuales son portadores conocidos de virus, bacterias y protozoos ³⁹³. Además de ubicuos, son muy difíciles de erradicar en las granjas ²⁵ apareciendo durante la vida del lote de aves así como durante la etapa de vaciado sanitario de las granjas ³⁷⁴. Existen varios trabajos que evalúan la supervivencia de *Campylobacter* en estos insectos en su superficie corporal, en su interior o en las deyecciones y han encontrado que la supervivencia de *C. jejuni* es relativamente corta: en la cutícula del insecto y en sus heces es de 12 horas, mientras que en el interior del insecto puede llegar a 72 horas ³⁸⁹. Pero por otra parte, se sabe que con la ingestión por parte de un ave de un solo adulto de este escarabajo que sea portador de *Campylobacter* se consigue una colonización eficaz del ave en un 99% de los casos ³⁸⁹. Como conclusión, estos insectos deberían ser incluidos en los programas de saneamiento de granjas, ya que, aunque teóricamente no tendrían mucha influencia en la colonización de un lote a otro (no sobreviven entre lotes de aves en una granja), sí producirían diseminación de la contaminación dentro de las aves del mismo lote ^{374,389}.

6.4.2.2. Manejo de los animales, actividades humanas en las granjas y estacionalidad

La producción de aves de consumo puede hacerse de forma intensiva, con un sistema cerrado y controlado y con alta densidad de aves en el medio, o puede hacerse de forma abierta o también denominada “orgánica” o “ecológica”, donde los animales disponen de un terreno al aire libre donde moverse más o menos libremente. Se estima que en los sistemas de producción orgánicos hay mayores tasas de prevalencia de *Campylobacter* que en las granjas convencionales (por ejemplo, 95-100% frente a un 55% respectivamente, en un estudio llevado a cabo en el Reino Unido) ⁹. Esto podría deberse a que en los sistemas orgánicos hay una mayor exposición a diferentes agentes ambientales que pueden ser fuente de colonización para las aves.

Por actividades humanas en las granjas nos referimos a todas aquellas que lleva a cabo de forma rutinaria el personal que trabaja en dicha granja: alimentación, limpieza, control sanitario, etc. El personal puede actuar como un vector mecánico de la bacteria en las granjas

^{214,420}. Sin embargo, existen bastantes estudios ^{5,10,106,274,287,420} que han identificado al “aclarado” como el principal factor de riesgo para la colonización de un lote por *Campylobacter*. El aclarado consiste en una reducción del número de animales en la granja, llevando un porcentaje variable de ellos a matadero (10-50%) ¹⁰, con una edad de 5-6 semanas y un peso menor que el comercializado como *broiler* aunque es el correspondiente a su edad. Estos pollos se comercializan en España como pollos para asar. Durante el aclarado pueden romperse medidas de bioseguridad en las granjas ya que supone la entrada de personal ajeno al manejo “habitual” de las aves, lo que ocasiona además estrés en ellas. De forma adicional, las aves que se destinan a matadero van a sufrir un ayuno al menos 6 horas previas a su sacrificio en matadero.

En los muestreos realizados durante el aclarado se consigue aislar *Campylobacter* a partir de muestras obtenidas de vehículos de transporte, equipamiento utilizado en el aclarado, personal y carreteras y caminos dentro de las granjas, siendo en ocasiones de los mismos genotipos que aparecen en las aves ¹⁰. Por tanto, la limpieza y desinfección del equipamiento utilizado va a ser vital para no introducir la infección en un lote negativo.

Las actividades relacionadas con el traslado de aves, entre fases de producción se relacionan también con la colonización por *Campylobacter*. Las cajas de transporte de los animales se han identificado como una de las fuentes de *Campylobacter* ^{34,166,323}. Algunos estudios han encontrado cepas viables en las cajas de transporte antes de su uso y con genotipos que aparecen después en las aves. Se ha determinado que la supervivencia de *Campylobacter* puede ser de hasta tres horas, tras la limpieza y desinfección de las mismas, un tiempo que estiman suficiente para colonizar las aves no colonizadas por *Campylobacter* en el tiempo medio de viaje de la granja a las plantas de procesado ¹⁶⁶.

6.4.2.3. Aves silvestres

Campylobacter jejuni y *C. coli* pueden colonizar el intestino de numerosas especies de aves silvestres ⁴¹⁶. Éstas, a través de sus deyecciones, pueden ser una fuente de infección si acceden a las naves de cría, si contaminan el agua y el suelo ²⁶⁶, o bien de forma indirecta, a través del calzado del personal de la granja ²⁵². Este riesgo es sin duda mucho más evidente si la cría de los animales se hace de manera orgánica, ya que no existen barreras físicas que impidan el contacto de las aves silvestres con las aves de corral ⁵⁷.

El potencial riesgo de las aves silvestres como fuente de infección en las granjas avícolas va a estar influido por la estación del año, ya que las poblaciones de aves silvestres fluctúan, por lo que, lógicamente, en los meses con mayor población de aves silvestres el riesgo de contaminación es más alto ¹⁹⁴.

Existe variabilidad de resultados en la investigación de las aves silvestres como fuente de colonización en granjas: i) estudios en los que no se consigue aislamiento de *Campylobacter* en las muestras de aves silvestres en las cercanías de las granjas ^{34,293}, ii) estudios en los que hay aislamiento de las mismas especies de *Campylobacter* tanto en aves silvestres como en las aves de consumo de las granjas cercanas, pero en las que los genotipos son muy diversos y difieren de aquellos aislados en las aves de consumo tanto en producción intensiva ^{32,190} como extensiva ⁵⁷ y iii) estudios en los que sí se llegan a aislar los mismos genotipos de *Campylobacter* tanto en las aves de corral como en las aves silvestres de las inmediaciones, pero no pueden determinar la dirección de la infección, es decir si la infección procede o es adquirida por las aves silvestres ⁷⁴.

En general parece haber una asociación de clones o genotipos de *C. jejuni* con determinadas especies de aves silvestres ⁴¹⁶, sin que estas poblaciones bacterianas colonicen eficazmente las aves de corral, por lo que se considera que no son un vector de colonización importante.

6.4.2.4. Ganado vacuno y porcino

La presencia de granjas de producción de otros animales de abasto en las cercanías de las granjas avícolas se considera como un factor de riesgo importante en la colonización por *Campylobacter*. De entre los diferentes animales de abasto, el ganado vacuno es la principal fuente potencial ^{106,324}. Mediante marcadores como serología ²⁶⁷ o MLST ³⁶⁴ se han identificado cepas de *Campylobacter* que parecen especialmente adaptadas al intestino de rumiantes como la vaca, por lo que podríamos hablar de “clones vacunos”.

Salvo alguna excepción ³⁴, la mayoría de trabajos encuentran los mismos genotipos en las aves y en el ganado vacuno cercano ^{180,265,439}, y en alguno en concreto se ha demostrado la circulación de cepas de *Campylobacter* entre ganado vacuno y aves de corral ³²⁴, por lo que parece claro que en algunas granjas, el ganado vacuno sería el reservorio u origen de *Campylobacter*, aunque como casi siempre, determinar la dirección de colonización es complejo.

Respecto al ganado porcino, debemos tener en cuenta que *C. coli* es la principal especie aislada en el cerdo, en algunos casos como especie exclusiva, sin que se aíslen o determinen otras especies del género *Campylobacter* ¹⁷⁹. *C. jejuni* también puede ser aislado, aunque en porcentajes muy variables (0 - 78.6%), en general, muy bajos ¹⁸⁵. La mayoría de trabajos descartan un papel del ganado porcino como fuente de infección en granjas avícolas. Mediante estudios por MLST se ha encontrado que las cepas de *C. coli* aisladas de cerdo son genéticamente distintas a las aisladas de pollo, y se apunta al carácter clonal de las cepas de *C. coli* por asociación entre genotipos de esta especie y sus hospedadores animales ^{93,255}.

6.4.2.5. Roedores, perros y otros mamíferos

En la mayoría de granjas se aplican programas de control de roedores, por lo tanto el riesgo potencial de estos animales como portadores de *Campylobacter* es bajo ²⁵². En algunos estudios, las heces de roedores se han mostrado negativas para cualquier especie de *Campylobacter* ^{274,301}.

Con respecto a otro tipo de animales en las cercanías de las granjas, varios trabajos no han conseguido aislar *Campylobacter* spp. a partir de las heces de caballos y pequeños mamíferos ^{34,274}. En oposición a esto, sí se consiguió aislar *C. jejuni* tanto en aves como en heces de perros de las cercanías de las granjas en varios estudios ^{190,432}, pero los genotipos no eran los mismos que se aislaban en las aves ¹⁹⁰.

Sin duda, parece evidente que una medida de bioseguridad básica debería ser evitar la presencia de otros animales, tanto de producción como accidentales en las mismas instalaciones o en instalaciones contiguas a las granjas avícolas. Aún así, en muchos casos es difícil dilucidar si estos animales son origen o consecuencia de la colonización de las aves de consumo ^{274,323}.

6.4.2.6. Ambiente exterior de la granja

Campylobacter no puede multiplicarse en el ambiente sin un hospedador, por tanto, toda aquella detección en el exterior va a provenir de una contaminación fecal por alguno de sus numerosos hospedadores animales ^{214,420}. Durante el periodo de viabilidad e infectividad de las bacterias en el exterior, éstas pueden ser introducidas en las granjas por diferentes vehículos: personal (calzado, ropa, etc.), insectos, roedores, etc.. ^{214,420}. La mayoría de estudios en los que se ha detectado *Campylobacter* spp. en el exterior de las granjas lo sitúan en charcos y zonas húmedas ^{34,190,252}.

La presencia de un genotipo de *Campylobacter* en el ambiente exterior de una granja no significa que esa sea la fuente de colonización, y de igual modo, el hecho de no detectar un genotipo presente en las aves en el ambiente exterior no significa tampoco que no esté realmente presente, ya que puede estar en un número suficientemente bajo y no ser detectado ⁵⁷, además, debemos considerar que la variedad de genotipos en el exterior de las granjas puede ser muy grande y la bacteria estar muy diseminada ¹⁶⁰ por lo que la detección no es sencilla. Muchos estudios no detectan *Campylobacter* en el ambiente exterior de las granjas hasta que un lote no es colonizado, por lo que en la mayoría de ocasiones la detección en el ambiente no sería la causa, sino la consecuencia de la contaminación ³⁴. Además, apoyando esta hipótesis, algunos estudios describen que durante los periodos de vaciado sanitario el

ambiente exterior siempre es negativo ^{274,301}. La detección de los mismos genotipos se ha conseguido en varios estudios ^{34,190,274,439} aunque, salvo excepciones ^{34,190}, no se puede afirmar con seguridad que el exterior sea el origen de la colonización en la granja.

Un factor importante a la hora de tener en cuenta el ambiente exterior de la granja como fuente de colonización es que siempre se obtiene una menor prevalencia de *Campylobacter* en muestras ambientales. Esto es debido, según algunos autores, a que *Campylobacter* tiene una pobre respuesta adaptativa al estrés ambiental ¹⁸⁰, provocado por la temperatura, el oxígeno atmosférico y la deshidratación ³²⁴. Sea por esa mala respuesta al estrés ambiental, a la presencia de formas VBNC ²¹⁴ (que podrían ser una consecuencia de ese estrés ambiental), o incluso a que los medios de enriquecimiento no son los adecuados, lo cierto es que la recuperación de *Campylobacter* en muestras ambientales suele ser de bajo rendimiento con una presencia intermitente de cepas en el exterior ³²³.

Se estima que con unas medidas de bioseguridad adecuadas se frenaría la contaminación desde el exterior ²⁷⁴, aunque parece claro que las medidas estándar establecidas en las granjas no evitan la entrada o salida de cepas de *Campylobacter* en las mismas ³²³.

6.4.2.7. Alimentación y cama de las aves

En el estudio de revisión de factores de riesgo de colonización en pollos por *Campylobacter* en el Reino Unido llevado a cabo en el año 2006 ⁵, se estimaba que los dos factores potenciales de riesgo menos probables para la entrada de *Campylobacter* en granjas de riesgo eran la comida de las aves así como la cama que cubre el suelo de las naves. Otros estudios en granjas de otros países confirmarían esta hipótesis ^{420,439}.

La comida que se utiliza es de tipo granulado, con muy baja humedad (8-10%) y en general lleva en muchos casos un proceso de pasteurización y de aireación para evitar la compactación del pellet y no tiene, por tanto, las condiciones idóneas para el crecimiento de *Campylobacter* ²⁹³.

Sin embargo, una vez colonizadas las aves, o al menos en un estadio inicial de colonización, la comida contaminada puede ayudar a propagar la infección dentro del lote de aves ^{214,371}.

Las virutas de madera utilizadas como cama de las aves, en general son de plantas resinosas y con muy baja humedad, por lo que la supervivencia de la bacteria en esta matriz es improbable ²⁵⁷. Además, suelen contener diferentes aditivos de carácter ácido, ya que las aves poseen bacterias en su tracto intestinal que generan gas amonio a partir de las excretas de ácido úrico. La acumulación de gas amonio no es conveniente para el crecimiento y desarrollo de las aves y gracias a estos aditivos se contrarresta la producción de amonio.

Al igual que con la alimentación, la cama podría ser un vehículo de propagación de la bacteria una vez colonizadas las aves, así como servir de reservorio entre lotes de aves. Por tanto debería evitarse reutilizar este material entre lotes diferentes de aves ⁴²⁰. Aún así, la baja supervivencia de *Campylobacter* en esta matriz es evidenciada en algunos estudios, donde durante el periodo de vaciado sanitario de las granjas nunca se detecta la bacteria ^{432,439}.

6.4.2.8. Agua y aerosoles

El agua de bebida utilizada en las granjas en general no debería constituir un riesgo de colonización siempre que ese agua provenga de la red general de abastecimiento o bien sea un agua tratada y potable, ya que el agua sin potabilizar sí se estima como un factor de riesgo probable de infección en granjas ^{5,190}.

Pese al uso de medios de enriquecimiento y técnicas de filtración, el cultivo de *Campylobacter* a partir de muestras de agua (como en la mayoría de muestras ambientales) es en muchas ocasiones de muy bajo rendimiento ^{160,323}. Esto se debe a que el agua de bebida no es un ambiente propicio para *Campylobacter*, debido a las bajas temperaturas, tensión de oxígeno, baja concentración de nutrientes ²⁶⁶ y los procesos de potabilización (adición de cloro o acidificantes o tratamiento con luz ultravioleta). Actualmente existe debate sobre la diferente resistencia de *Campylobacter* al cloro, puesto que existe algún estudio en el que el potencial infectivo de la bacteria parece aumentar tras tratamientos de acidificación y cloración ²⁶⁶. En definitiva, la supervivencia de la bacteria en este ambiente puede deberse a i) formación del estado VBNC, cuyo potencial de colonización está en discusión ²¹⁴, ii) existencia de cepas especialmente adaptadas al ambiente acuático ²⁷⁶ o iii) supervivencia en el interior de protozoos y biofilms ^{380,402}.

El agua de bebida en el interior de las granjas puede actuar como un vehículo eficaz de propagación de la contaminación ^{106,266}. En general, los bebederos se contaminan a la vez que el lote de aves, diseminándose la bacteria de forma muy rápida, detectándose en todos los bebederos de la nave de producción ⁴³⁹. Sin embargo es difícil detectar la bacteria en los bebederos en aquellos periodos en los que el lote de aves es negativo a *Campylobacter* ^{274,301}.

Una de las posibilidades de supervivencia de *Campylobacter* en el agua es mediante organismos unicelulares eucariotas (protozoos) como mecanismo de resistencia a las condiciones del medio. Se sabe que algunas bacterias pueden sobrevivir, multiplicarse o ser transportadas en organismos protozoos. Muchas están adaptadas para la supervivencia en elementos de la ruta de maduración de vacuolas alimenticias, o bien sobrevivir con un crecimiento saprofítico en la cubierta exterior de los protozoos, sobre materiales excretados

por ellos ^{20,379}. Algunos patógenos como *Legionella pneumophila* y *Mycobacterium* spp. no solo pueden sobrevivir, sino que su virulencia aumenta tras cocultivo con protozoos ²⁰.

La presencia de protozoos en las granjas avícolas es un hecho documentado, incluso tras un periodo de vaciado sanitario y desinfección ²⁰. De entre los protozoos identificados destacan especies como *Acanthamoeba castellanii* y *Tetrahymena pyriformis*, conocidos hospedadores de *Campylobacter* spp. ³⁸⁰. En el interior de las células de estas dos especies *C. jejuni* es hasta 50 veces más resistente a la cloración del agua ²⁰². Además, cuando están internalizadas en estos organismos, se observa un menor decrecimiento en la viabilidad en condiciones de baja temperatura y escasos nutrientes, por lo que el potencial de colonización aumenta ³⁸⁰.

Otra manera de diseminación a través del agua podría ser a través de aerosoles. Los aerosoles pueden ser un vehículo de propagación de la bacteria dentro del lote de aves ^{34,214,288} pudiendo ser detectados en el exterior de las granjas ³⁴, hasta en una distancia de 20 metros de las mismas ³²³. El uso de sistemas apropiados de ventilación como medida de bioseguridad reduce en gran medida el riesgo de contaminación por aerosoles en granjas.

6.5. Dinámica de poblaciones de *Campylobacter* spp. en granjas avícolas

El comportamiento de las poblaciones de *C. jejuni* y *C. coli* en un lote de aves, a lo largo de la vida productiva de éstas, va a reflejar en cierta forma aspectos de la bacteria como son la capacidad de colonización en las aves, la capacidad de modificar su genoma (transformación, conjugación, etc..) y las posibles fuentes de colonización diferentes que afectarían al lote de aves de estudio.

El estudio de las poblaciones de *C. jejuni* y *C. coli* en granjas avícolas, al igual que en otro tipo de estudio epidemiológico se encuentra con el problema de que la estructura de las poblaciones de estas especies aisladas en aves es débilmente clonal ^{71,423}. Sin embargo, pese a esta inestabilidad, y al igual que en estudios epidemiológicos en campilobacteriosis, la aplicación conjunta de varios métodos de subtipificación molecular debería describir con éxito el comportamiento de las poblaciones de *Campylobacter* dentro de una granja de aves. Es difícil generalizar sobre la dinámica de las poblaciones de *C. jejuni* y *C. coli* en las granjas de aves, puesto que dependería en gran medida de las fuentes de colonización que existan en esa granja, así como de las características propias de las cepas colonizadoras.

6.5.1. Diversidad de genotipos en granjas avícolas

En cuanto a la diversidad de genotipos en granjas avícolas, existen estudios en los que solamente se detecta un bajo número de genotipos en las aves, incluso lotes de aves en los que solamente se detectaría un solo genotipo colonizándolas ^{76,326}, a veces de forma exclusiva, desde el inicio de la producción hasta su destino en matadero ³⁶⁹. En un estudio llevado a cabo en el Reino Unido se observó en granjas de producción intensiva que, pese a aislar varios genotipos diferentes durante la vida de los animales, en matadero solamente se obtenían uno o dos genotipos ³²⁴. Esto significaría que finalmente solo una o dos poblaciones de *Campylobacter* podrían sobrevivir en toda la vida productiva del lote de aves, posiblemente debido a un mejor potencial de colonización ⁸.

Otros estudios en cambio encuentran múltiples genotipos bien de manera simultánea en un lote o de forma sucesiva. Messens y colaboradores encontraron que en un 42.9 % de los lotes de su estudio aparecían múltiples genotipos ²⁵², en otros estudios los porcentajes son semejantes, con un 40% ^{34,369} o mayores, con un 77% ¹⁶⁹. Los lotes de aves se colonizarían inicialmente por un número bajo de genotipos, y posteriormente iría aumentando el número (diversidad) con la edad de las aves ⁵⁸. Esto sugeriría que las aves están expuestas a un número creciente de genotipos según crecen y que quizás estos genotipos se van acumulando antes que irse excluyendo unos a otros. Diferentes estudios apoyan esta idea, observando una mayor diversidad de genotipos en verano, con mayor número de fuentes potenciales de entrada de *Campylobacter* spp. ²⁰⁶.

6.5.2. Cepas genéticamente estables vs. cepas inestables

En la diversidad de genotipos que se pueden encontrar en los estudios poblacionales en granjas, puede haber genotipos que claramente son diferentes entre sí, lo que apuntaría a una fuente de infección externa, o bien, como algunos estudios encuentran, que hubiese una extensa variación de subtipos ^{89,160}, que aparentemente derivarían de la misma cepa parental. Esta variación de subtipos surgiría a partir de reordenamientos genéticos que ocurrirían dentro del tracto intestinal del ave tras la colonización del mismo por *Campylobacter* spp. ^{157,423}.

Parece existir una fuerte correlación entre diversidad genética bacteriana y capacidad de colonización ^{58,428}, ya que el incremento de la diversidad genética mejoraría la supervivencia de las subpoblaciones de *Campylobacter*. Esta variabilidad se ha encontrado sobre todo en zonas del genoma que participan en la síntesis y modificación de estructuras de superficie: flagelos, LOS, cápsula, etc.. ⁴²⁸, todas ellas estructuras relacionadas con la evasión de la

inmunidad del hospedador. De forma minoritaria, algunos estudios encuentran cepas sin apenas subtipos, es decir, con un carácter de aparente estabilidad genética ³⁰².

6.5.3. Cepas persistentes vs. cepas transitorias

Las poblaciones de *Campylobacter* van a tener diferente potencial de colonización para las aves de consumo, apareciendo cepas que pueden colonizar de forma persistente un lote de aves y cepas que pueden colonizar el lote pero que son sustituidas por otras a lo largo del tiempo.

En un estudio realizado en Dinamarca en el año 2001 ³⁰², se encontró que en un 63% de los lotes estudiados había clones de *Campylobacter* persistentes que se asociaban exclusivamente a lotes concretos de aves, es decir, se aíslan durante toda la vida de las aves del lote. Esta persistencia de genotipos en lotes y en granjas de aves apuntaría a un origen común de las cepas, específico del lote de aves estudiado, como pudiera ser el transporte de comida, agua de bebida, o la propia comida de las aves ²⁰⁶.

Sin embargo, la mayoría de estudios apuntan a la idea de que la mayoría de genotipos de las aves serían de carácter transitorio ^{34,160,252,369}, y en general, habría un subtipo predominante que gradualmente se vería sobrepasado o incluso reemplazado por otros ³⁴. Algunos genotipos solo aparecerían en determinadas épocas del año ²⁵², por lo que estarían asociados a algún tipo de fuente de infección relacionada con esa época concreta del año: insectos, aves silvestres, etc...

Un caso “extremo” de cepas transitorias en las granjas son aquellas con un bajo o nulo nivel de colonización. Como ya vimos, hay genotipos de *Campylobacter* que se asocian a hospedadores animales muy concretos y que no pueden colonizar el tejido intestinal de las aves de consumo ^{255,416}.

7. Resistencia a antimicrobianos en *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*

Es característico en la producción intensiva de carne de pollo en los países industrializados la existencia de una alta densidad de animales por metro cuadrado. Esto hace que en el caso de que un patógeno acceda a una de estas instalaciones, pueda diseminarse con mucha facilidad, en cuyo caso sería necesario utilizar los antimicrobianos que permita la legislación del país correspondiente.

En los años 40 se observó de forma empírica que los animales que eran alimentados con micelios desecados de *Streptomyces aureofaciens* conteniendo clortetraciclina producida por este microorganismo conseguían un mayor crecimiento ⁵¹. El mecanismo exacto por el que los antibióticos actúan como promotores de crecimiento no es del todo conocido, aunque se estima que puede regular las poblaciones bacterianas y por tanto la disponibilidad de nutrientes y vitaminas.

El amplio y extendido uso de antibióticos como aditivos en alimentación animal pudo contribuir al desarrollo de poblaciones de bacterias patógenas para el hombre que sean resistentes a drogas usadas en el tratamiento de infecciones. Esta preocupación hizo que en los años 70 se empezasen a prohibir algunos antibióticos como promotores de crecimiento: tetraciclinas y penicilinas en 1976 y oleandomicina en 1979. En 1998 se prohibió el uso como promotores de crecimiento de la bacitracina y la avoparcina y un año después la espiromicina y la virginiamicina. Finalmente en 2005, fueron prohibidos la avilamicina y el flavofosfolipol ⁵¹. En el año 1999 el “*Economic and Social Committee of the EU*” junto con la OMS desautorizaron el uso de cualquier antibiótico como promotor de crecimiento en la Unión Europea ⁵¹. Curiosamente, el descenso en el uso de antibióticos como promotores de crecimiento tuvo un efecto inicial de aumento de las tasas de resistencia en bacterias aisladas en animales de abasto, debido a un aumento del uso de antibióticos, pero como agentes terapéuticos ⁹¹. Algunos países, como por ejemplo Suecia, han demostrado que aumentando las barreras higiénicas y la bioseguridad se consigue reducir el uso de antibióticos y por tanto el riesgo de aparición de poblaciones de bacterias resistentes ⁴²⁶. Las diferencias en cuanto a consumo de antibióticos en producción animal podrían explicar los distintos valores de resistencia que se encuentran en bacterias zoonóticas. Por ejemplo, en países como Corea del Sur se permite el uso de enrofloxacino en medicina veterinaria, y se ha observado cómo las tasas de resistencia pasaron del 1.6% frente a quinolonas en 1989 a un 95.9% en 2006 ¹⁷⁶. En Australia, por el contrario, nunca se autorizó el uso de este antibiótico en terapéutica en aves de ahí las bajas tasas de resistencia que presenta *Campylobacter* frente a las quinolonas ²⁷⁵. Otro ejemplo lo proporcionan las comparaciones de datos entre granjas orgánicas (sin ningún tratamiento antibiótico) frente a granjas convencionales. En las orgánicas siempre hay porcentajes de resistencia inferiores ^{91,154,399}.

Los antibióticos pueden ser utilizados en veterinaria con cuatro propósitos ¹⁴⁷: i) promotores de crecimiento: Permitido en algunos países como USA, Canadá, etc.. pero prohibidos en la Unión Europea desde finales de los 90, ii) profilaxis de enfermedades: Se evitan enfermedades infecciosas, aplicándose de forma grupal al lote de animales iii) metafilaxis de enfermedades: Se aplica de forma grupal cuando tenemos la seguridad de que lote de

animales ha estado en contacto con el agente infeccioso, y aún sin observar síntomas, se tratan infecciones incipientes y posibles contagios con otros lotes de animales, y iv) terapéutica: Para el tratamiento de enfermedades. En la Unión Europea los antibióticos se admiten solamente con un uso terapéutico, con la excepción de los agentes coccidiostáticos, en los que se permite un uso profiláctico ³⁵³.

Las resistencias a antimicrobianos en bacterias zoonóticas aisladas en alimentos pueden reducir la efectividad del tratamiento antibiótico de la infección en el hombre. Además, no existe un número infinito de agentes terapéuticos efectivos para el tratamiento de infecciones tanto en el hombre como en los animales. La resistencia a antibióticos aumenta a mayor velocidad que el desarrollo y comercialización de nuevos antibióticos (requieren procesos muy largos para su autorización), por tanto tenemos que ser muy prudentes a la hora de elegir los antibióticos a utilizar tanto en humanos y animales ²⁵⁸.

7.1. Métodos aceptados de evaluación de resistencias a antimicrobianos en *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*

En la evaluación de la resistencia a antimicrobianos se manejan dos conceptos como son la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) y la CMB (Concentración Mínima Bactericida). La CMI es la concentración de antibiótico mínima necesaria para inhibir el crecimiento *in vitro* de un inóculo de bacteria de concentración conocida, mientras que la CMB es aquella concentración mínima de antibiótico que induce la muerte *in vitro* del 99.9% de la población bacteriana inoculada. Por lo general se usa el valor de CMI para definir si una bacteria es sensible o resistente a una sustancia antimicrobiana.

Los métodos de evaluación de resistencias de las cepas de *Campylobacter* spp. pueden ser clasificados en dos grupos: i) basados en la dilución del antibiótico en un medio de cultivo (Macro/microdilución en caldo, dilución en agar) y ii) basados en difusión del antibiótico en la superficie de un medio de cultivo (Método de difusión en disco, Epsilon-test) ¹:

- Macro/microdilución en caldo (BDM): consiste en la preparación de diluciones seriadas de un antibiótico en un medio de cultivo líquido. Se debe inocular una cantidad estandarizada de bacteria y tras un periodo de incubación que depende de la especie bacteriana, se observa en que tubos hay turbidez (crecimiento) y en cuáles no. Cuando esta técnica se miniaturiza en placas de 96 pocillos se denomina microdilución. El valor de CMI será la concentración más baja del tubo o pocillo en el que no se observe crecimiento comparada con la anterior dilución que sí posea crecimiento.

- Dilución en agar (ADM): al igual que en la dilución en caldo, se realizan diluciones seriadas de un antibiótico, salvo que en este caso es en un medio sólido. Se siembra un volumen de concentración conocida y estándar de bacteria, cultivándose en las condiciones recomendadas para la especie. Al igual que en BDM, el valor de CMI real estará comprendido entre las concentraciones de las placas de cultivo en las que hay inhibición de crecimiento con la anterior concentración que sí posee crecimiento.
- Difusión en disco o método de Kirby-Bauer (DDM): se utilizan unos discos impregnados con una cantidad fija de un antibiótico. Se siembra y extiende uniformemente un volumen de bacteria en concentración conocida (por medición de turbidez) en la superficie del medio de cultivo. Posteriormente se coloca el disco de antibiótico y este difundirá radialmente desde el mismo, creando un gradiente de concentración del antibiótico. Tras la incubación, se observa un halo de un diámetro determinado (mm) alrededor del disco donde la bacteria no ha crecido. La zona del halo donde se visualiza crecimiento bacteriano y la zona con inhibición de crecimiento se conoce como concentración crítica, y es un valor que podemos asemejar al valor de CMI.
- Epsilon-Test (E-test): se utiliza una tira de material no poroso que lleva incorporado a lo largo de ella una serie de diluciones del antibiótico, hasta 15 en la mayoría de casos. Se siembra la bacteria de igual modo que en DDM; al colocar la tira E-test en la superficie del medio de cultivo, el antibiótico difunde desde la tira hacia el agar. La bacteria va a crecer observándose un halo sin crecimiento de tipo elipsoidal, contactando con la tira en aquel valor de concentración que coincida con la CMI de la cepa.

El “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI) es una organización internacional que desarrolla y estandariza diferentes métodos de laboratorio en medicina clínica (www.clsi.org). Un subcomité del mismo se encarga de los métodos de susceptibilidad antimicrobiana proporcionando guías y recomendaciones para un mejor tratamiento antibiótico de los pacientes mediante el desarrollo de métodos de referencia estándar, controles de calidad y criterios interpretativos de resultados, entre otros.

No todos los métodos de determinación de susceptibilidad antes mencionados están estandarizados para *Campylobacter*, ni tampoco existen valores de CMI internacionalmente admitidos para todos los antibióticos aplicados o estudiados en *Campylobacter*. El CLSI considera el ADM como el estándar para comprobar la susceptibilidad frente a antibióticos en *C. jejuni*¹⁴⁹. El método de difusión en disco (DDM) sí está estandarizado por el CLSI, aunque solamente recomiendan su uso para el *screening* de cepas resistentes a eritromicina y ciprofloxacino²¹⁶; así, cuando no se observe un halo de inhibición la cepa se considera resistente, mientras que ante la presencia de un halo de inhibición se debería determinar la

CMI de esas cepas por otros métodos. Aunque este método no proporciona un valor de CMI, existen diferentes organizaciones como el *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), que poseen unos valores de corte en el diámetro del halo de inhibición para determinar la resistencia o no de la cepa testada.

Método	Ventajas	Desventajas
Dilución en Agar (ADM)	Método estándar en <i>Campylobacter</i> spp. para el CLSI	Preparación del medio requiere mucho tiempo
	Obtención de valor CMI	Coste de placas comerciales
	Repetibilidad	Vida de los antibióticos en el medio es corta
	Valores de CMI disponibles de diferentes organizaciones	No existe guía del CLSI para muchos antibióticos ni valores de CMI
Dilución en caldo (BDM)	Método automatizado	No existe una guía del CLSI para <i>Campylobacter</i> spp. para muchos antibióticos ni valores de CMI de referencia
	Paneles comerciales	
	Eficiente en tiempo y coste	
	Microdilución en caldo buena alternativa ante un número elevado de cepas	
Difusión en Disco (DDM)	Facilidad del método y coste	No se obtiene un valor de CMI. Requiere posterior cálculo de CMI
	Método estandarizado por el CLSI	CLSI solo lo admite para screening de eritromicina y ciprofloxacino
	Screening de un alto número de cepas	
	Fácil de interpretar	Discrepancia en valores de corte para discriminar entre resistentes y sensibles
	En general concordancia de resultados con otros métodos	
	Disponibilidad de discos de un gran número de antibióticos	
Epsilon-test (E-test)	Proporciona un valor de CMI directo	No estandarizado por el CLSI
	Buena correspondencia con los resultados obtenidos por ADM o BDM	Pueden existir variaciones en una o dos diluciones con algunos grupos de antibióticos
	Coste inferior a ADM o BDM	
	Poco laborioso y más rápido que ADM o BDM	Posible sobreestimación de resistencia a ácido nalidíxico y tetraciclina
	Disponible en un alto rango de concentraciones y para un gran número de antibióticos.	

Tabla 5. Tabla resumen con las ventajas y desventajas de cada método para evaluar la susceptibilidad frente a antibióticos.

7.2. Porcentajes de resistencia frente a antimicrobianos en *Campylobacter jejuni* y *C. coli* aislados en aves de consumo

La principal característica de los datos de tasas de resistencias en *Campylobacter jejuni* y *C. coli* aislados a partir de aves de consumo es que, al igual que ocurre con los estudios de prevalencia del microorganismo, los datos son muy variables entre países e incluso dentro de un mismo país ¹⁴⁷. La comparación entre los datos de diferentes estudios en resistencia es complicada debido a las diferencias metodológicas entre los programas llevados a cabo en los países, como puede ser que se analicen diferentes puntos de muestreo (en granja, en matadero,..) o bien tipos de muestra (cepas de canales de pollo, contenido intestinal, etc.), métodos de aislamiento de bacterias, cultivo y metodología de laboratorio (diferentes métodos para determinar la sensibilidad, interpretaciones diferentes de los valores obtenidos, etc) ⁸⁴. Por otra parte, la variación de los datos puede reflejar también las distintas formas de manejo de los animales y/o de pautas de administración de antibióticos.

La mayoría de estudios de resistencias de cepas de *Campylobacter* spp. aisladas en aves se centran en la especie *C. jejuni*, ya que es la principal especie aislada en carne de pollo. Estos estudios hacen hincapié en aquellos antibióticos que pueden interferir en el tratamiento de campilobacteriosis en el hombre, es decir, quinolonas y macrólidos y en menor número las tetraciclinas.

Generalmente, los compuestos más comúnmente utilizados en medicina veterinaria para animales de abasto (con algunas variaciones entre países) son: tetraciclinas, β -lactámicos, sulfonamidas, quinolonas, aminoglicósidos y macrólidos (http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/2009/11/WC500015452.pdf página 37. Último acceso 28/04/2014). Sería por tanto, de esperar mayores tasas de resistencia a estos antimicrobianos en bacterias zoonóticas, como *Campylobacter* spp.

7.2.1. Quinolonas y fluoroquinolonas

En Estados Unidos, la FDA (*Food and Drug Administration*) aprobó en la década de los 90 el uso del enrofloxacin (fluoroquinolona) para el tratamiento de la colibacilosis (un conjunto de diferentes infecciones causadas por *E. coli*) en pollos y pavos. A raíz de este uso se observó un incremento paulatino de resistencia a quinolonas en bacterias aisladas de aves en un corto periodo de tiempo ⁷⁹. Siendo *Campylobacter* una bacteria común en aves de consumo, tampoco fue ajena a este comportamiento. De hecho, en los años 80 no se aislaban cepas de *C. jejuni* procedentes de aves resistentes a quinolonas, mientras que en 2001 las tasas alcanzaban valores de un 40.5% en EEUU ²⁶¹.

La FDA prohibió el uso del enrofloxacin en la cría de aves de corral en septiembre del año 2005. Desde esa fecha se ha observado para algunos microorganismos presentes en el intestino de las aves como *Enterococcus faecalis* o *E. coli* un descenso en la prevalencia de resistencia a quinolonas ⁴³⁸. Sin embargo, en el caso de *Campylobacter*, los porcentajes de resistencia no solo se han mantenido estables, sino que han aumentado. La resistencia a quinolonas en *Campylobacter*, se produce de forma rápida y persistente observándose un aumento en la CMI a este antibiótico (por ejemplo, de 0.25 µg/ml a 32 µg/ml) tras tratamiento con fluoroquinolonas ⁴³⁸.

Se ha teorizado sobre la relación que pudiera haber entre el aumento de resistencia en *Campylobacter* aislado de aves de consumo con el aumento de resistencias en pacientes. De hecho, se ha observado en varios países como EEUU, Bélgica, Holanda y España, que tras la autorización del uso de quinolonas en terapéutica en aves, las tasas de resistencia encontradas en cepas aisladas en humanos se dispararon en pocos años ²⁷⁵.

Como podemos ver en la tabla 6, con los datos bibliográficos disponibles es difícil encontrar países en los que la tasa de resistencia a quinolonas tanto para *C. jejuni* como *C. coli*, sea inferior al 10%. Entre los países europeos con menores tasas de resistencia destacan países como Islandia, con valores inferiores al 1% frente a ácido nalidíxico y enrofloxacin ⁴⁰¹.

Por lo general, los porcentajes de resistencia a ácido nalidíxico se correlacionan prácticamente con los de resistencia a ciprofloxacino. Pero también pueden aparecer poblaciones con un fenotipo diferente, atípico: sensibles a ácido nalidíxico y resistentes a ciprofloxacino. Esto, aunque en principio contradictorio (las fluoroquinolonas como el ciprofloxacino son de posterior síntesis al ácido nalidíxico y tienen mayor actividad y espectro antimicrobiano) se ha observado en aislados de origen bovino en Reino Unido ⁸⁴ y también en cepas de origen humano ¹⁹.

En España, al igual que en otros países, la resistencia frente a quinolonas en *Campylobacter* era prácticamente inexistente antes de la década de los 80. Durante los años 80 las cifras de resistencia en cepas de origen clínico para *C. jejuni* llegaban hasta un 11%, pasando a valores del 85% a finales de los años 90 ³¹⁰. De igual modo, en cepas de *C. jejuni* de origen avícola, se pasó de valores de un 3-8% en la década de los 80 a cifras de un 98.7% y un 100% en estudios del 1997-1998 ³⁴³ para *C. jejuni* y *C. coli*, respectivamente. Estos datos tan elevados se encuentran también en otros estudios posteriores para ambas especies: 93.1% frente a nalidíxico y 89.7% frente a ciprofloxacino en *C. coli* en 2003-2005⁸⁴ y un 95.4% frente al ciprofloxacino en el 2011 para *C. jejuni* ²⁵⁰. Por el contrario, en un estudio llevado a cabo en granjas de cría orgánica, donde no hay empleo de sustancias antimicrobianas, los datos de

resistencia en *C. jejuni* para el ácido nalidíxico y el ciprofloxacino eran de un 57.9% ²⁸³, sensiblemente inferiores al resto de estudios.

País	<i>C. jejuni</i>		<i>C. coli</i>		Referencia
	Ácido Nalidíxico	Ciprofloxacino	Ácido Nalidíxico	Ciprofloxacino	
España	98.7%	95.4%	93.1%	89.7%	Melero 2012 ²⁵⁰ , Sáenz 2000 ³⁴³ §
Holanda	52.6%	47.4%	-	-	de Jong 2012 ⁸⁴ †
Francia	17.4%	17.4%	40%	40%	de Jong 2012 ⁸⁴
Alemania	30%	30%	-	70.6%	de Jong 2012 ⁸⁴
Reino Unido	11.8%	11.8%	55%	60%	Luber 2003 ²³¹ †
Irlanda	18%	18%	7.7%	8.5%	de Jong 2012 ⁸⁴
Polonia	41.7%	41.7%	57.5%	57.5%	McGill 2006 ²⁴⁶
Islandia	1%	-	30.8%	-	Rozynek 2008 ³³⁸
Noruega	0%	0%	-	-	Thorsteinsdottir 2008 ⁴⁰¹
Italia	80%	53.3%	82.6%	60.9%	Norström 2007 ²⁷²
Bélgica	39.5%	38%	69.8%	69.5%	Sammarco 2010 ³⁵³
Suiza	-	18.9%	-	26.8%	Mattheus 2012 ²⁴⁴
Dinamarca	17%	20%	-	0%	Wirz 2010 ⁴²⁹
Japón	12.8%	12%	25%	25%	DANMAP*
China	99%	99.5%	100%	100%	Ishihara 2004 ¹⁸³
Corea del Sur	96.2%	96.2%	100%	97.1%	Chen 2010 ⁷²
Tailandia	77%	77%	-	-	Hong 2007 ¹⁷⁶
Turquía	79.4%	74.2%	-	-	Boonmar 2007 ³⁰
EEUU	-	17.2%	21%	25.9%	Cokal 2009 ⁵⁶
Canadá	0%	0%	44%	43%	Zhao 2010 ⁴³⁸
Chile	11.8%	11.8%	-	-	Thibodeau 2011 ³⁹⁹
Brasil	-	-	-	27.8%	Larkin 2006 ²¹⁰ †
Australia	0%	0%	0%	0%	Rivera 2011 ³²⁷
N. Zelanda	0%	0%	-	-	Aquino 2002 ¹⁴
Sudáfrica	64%	64%	-	-	Miflin 2007 ²⁵⁴
Senegal	48.4%	48.4%	59.7%	48.6%	Pleydell 2010 ³⁰⁸
Etiopía	0%	0%	0%	0%	Jonker 2010 ¹⁹³
					Cardinale 2005 ⁵⁰
					Ewnetu 2010 ¹¹¹

Tabla 6. Datos de resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas en cepas de origen aviar de *C. jejuni* y *C. coli* de diferentes países. §: Datos para ácido nalidíxico en *C. jejuni*. †: Datos para *C. coli*. * Datos del DANMAP (Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme) accesibles en http://www.danmap.org/Downloads/~media/Projekt%20sites/Danmap/DANMAP%20reports/Danmap_2010.ashx

7.2.2. Macrólidos

La resistencia a macrólidos en *Campylobacter* spp. aparece claramente distribuida en dos grupos de cepas según los valores de CMI ²⁹¹:

- i) 8-64 mg/L: resistencia baja e intermedia
- ii) >256 mg/L: alta resistencia

Algunos macrólidos como la tilosina y la espiramicina han sido muy utilizados a nivel mundial como promotores de crecimiento en cerdos y pollos respectivamente, hasta su prohibición en la UE en el año 1998 ⁹¹. Este uso como promotores de crecimiento (dosis subterapéuticas) durante tiempo prolongado provocaría la aparición de resistencias, mantenidas por la presión antibiótica. Sin embargo, para los macrólidos, cuando desaparece la presión antibiótica, las poblaciones resistentes desaparecen en relativamente poco tiempo ²²⁹. Esto se ha observado de forma experimental tras la prohibición de la tilosina como promotor de crecimiento en cerdos, lo que hizo que el número de *C. coli* resistentes a eritromicina descendiese drásticamente en Dinamarca ²²⁹.

Se han observado diferencias significativas entre los porcentajes de resistencia frente a macrólidos en las cepas de *Campylobacter* dependiendo de si el origen de los aislados es en cerdo o pollo. Así, para la especie *C. coli* aislada de pollo los porcentajes oscilaban entre 11-31%, mientras que en cerdo oscilaban entre 48-78% ²⁵⁸ (datos en Francia, del periodo 1999-2003). En otros países como EEUU y Canadá se da el mismo fenómeno, las cepas de *C. coli* aisladas de pollo, ganado vacuno o de origen humano tienen menor resistencia a macrólidos que las cepas de *C. coli* aisladas de cerdo ^{27,229}. El porqué de esta mayor resistencia en las cepas de *C. coli* aisladas en cerdo obedecería no solo a una mayor resistencia intrínseca a los macrólidos en esta especie, sino también a un mayor uso de macrólidos de forma terapéutica en la cría de ganado porcino.

Dentro de las cepas de *Campylobacter* aisladas en aves de consumo hay marcadas diferencias en los porcentajes de resistencia entre las dos especies principales, *C. jejuni* y *C. coli*. Así, como se ve en la tabla 7, salvo excepciones, los datos de resistencia en *C. jejuni* son inferiores a un 5% en la mayoría de casos. Por el contrario, para *C. coli*, muchos países superan el 10% de resistencia e incluso existen casos como China donde se encuentran porcentajes del 100% ⁷². Las diferencias en legislación entre países para la autorización de antibióticos como promotores de crecimiento y las diferencias en la cantidad de antibióticos consumidos por los animales de abasto en cada país podrían explicar estas diferencias. Así, por ejemplo, el consumo de antibióticos en producción animal en Corea del Sur se estima como 16 veces

mayor que en Dinamarca ¹⁷⁶, y como podemos ver en la tabla 7, las diferencias para macrólidos son evidentes: 5.6% vs. 0% para *C. jejuni* y 25% vs. 0% para *C. coli*.

Se desconoce porque *C. coli* es más resistente a macrólidos *per se* que *C. jejuni*, dado que en ausencia de presión antibiótica ambas especies tendrían el mismo coste biológico para mantener los mecanismos de resistencia a macrólidos ^{42,229}. Afortunadamente, a diferencia de otros antibióticos como las quinolonas, los porcentajes de resistencia frente a macrólidos son, por lo general, bajos, sin que se observe una tendencia a aumentar con el tiempo. Esto es importante, ya que se considera a los macrólidos como la eritromicina el antibiótico de elección frente a las campilobacteriosis severas en humanos ²²⁹.

País	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	Referencia
España	0%	24.1%	Melero 2012 ²⁵⁰ , de Jong 2012 ⁸⁴ †
Holanda	0%	-	de Jong 2012 ⁸⁴
Francia	0%	13.3%	de Jong 2012 ⁸⁴
Alemania	0%	5.9%	de Jong 2012 ⁸⁴ , Lubert 2003 ²³¹ †
Reino Unido	0%	15%	de Jong 2012 ⁸⁴
Irlanda	5.2%	5.9%	McGill 2006 ²⁴⁶
Polonia	0%	0%	Rozynek 2008 ³³⁸
Islandia	0%	0%	Thorsteinsdottir 2008 ⁴⁰¹
Italia	30%	43.5%	Sammarco 2010 ³⁵³
Bélgica	6%	13%	Mattheus 2012 ²⁴⁴
Suiza	0%	3.1%	Wirz 2010 ⁴²⁹
Dinamarca	0%	0%	DANMAP*
Japón	0%	25%	Ishihara 2004 ¹⁸³
China	26.7%	100%	Chen 2010 ⁷²
Corea del Sur	5.7%	25%	Hong 2007 ¹⁷⁶
Tailandia	17%	-	Boonmar 2007 ³⁰
EEUU	<1%	6%	Zhao 2010 ⁴³⁸
Canadá	6%	20%	Thibodeau 2011 ³⁹⁹ , Larkin 2006 ²¹⁰ †
Chile	0%	-	Rivera 2011 ³²⁷
Brasil	-	38.9%	Aquino 2002 ¹⁴
Australia	0%	11.1%	Miflin 2007 ²⁵⁴
Nueva Zelanda	0.5%	-	Pleydell 2010 ³⁰⁸
Sudáfrica	50%	-	Jonker 2010 ¹⁹³
Senegal	9.1%	12.5%	Cardinale 2005 ⁵⁰
Etiopía	14.9%	0%	Ewnetu 2010 ¹¹¹

Tabla 7. Datos de resistencia a macrólidos en *C. jejuni* y *C. coli* aislados de pollo en diferentes países. †: Datos para *C. coli*. *Datos de DANMAP accesibles en http://www.danmap.org/Downloads/~media/Projekt%20sites/Danmap/DANMAP%20reports/Danmap_2010.ashx

En España, los datos disponibles de resistencia a macrólidos en cepas de origen aviar indican que la resistencia a macrólidos es prácticamente inexistente para *C. jejuni* ^{250,283,343}, tanto en granjas convencionales como en granjas orgánicas. Sin embargo, los datos para *C. coli* disponibles del periodo 2003-2005 indicaban un 24.1% de resistencia frente a eritromicina ⁸⁴,

datos superiores a la mayoría de países europeos y similares a otros como Canadá, Japón o Corea del Sur.

7.2.3. β -lactámicos

Respecto a la resistencia a β -lactámicos como la ampicilina o la amoxicilina, debemos tener en cuenta dos factores que podrían explicar los valores observados para *Campylobacter* en los diferentes estudios: i) no es un agente terapéutico utilizado para el tratamiento de las campilobacteriosis, de hecho la investigación de las tasas de resistencia de esta familia de antibióticos no es considerada prioritaria por algunos organismos internacionales como el EUCAST y ii) parece existir una cierta resistencia intrínseca a varios compuestos dentro de este grupo de antimicrobianos por parte de *Campylobacter* spp.^{144,315}. Los datos existentes reflejan mucha variabilidad, por ejemplo para *C. jejuni* podemos encontrar desde porcentajes muy bajos, no superiores a un 4% en Canadá y países nórdicos como Islandia y Noruega, hasta porcentajes de un 68% en Sudáfrica. Pero por lo general los valores oscilan entre un 20-40% (Tabla 8).

País	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	Referencia
España	47.4%	90%	Sáenz 2000 ³⁴³
Irlanda	24%	28%	McGill 2006 ²⁴⁶
Polonia	13.3%	17.5%	Rozynek 2008 ³³⁸
Noruega	4%	-	Norström 2007 ²⁷²
Alemania	20.2%	23.5%	Luber 2003 ²³¹
Francia	19.4%	45.8%	Desmonts 2004 ⁹¹
Islandia	3.7%	0%	Thorsteinsdottir 2008 ⁴⁰¹
Reino Unido	25%	-	Gormley 2010 ¹³⁹
Italia	43.3%	39.1%	Sammarco 2010 ³⁵³
Bélgica	37.4%	30.8%	Mattheus 2012 ²⁴⁴
Suiza	13%	-	Kittl 2010 ²⁰⁴
Japón	16.4%	19.6%	Haruna 2012 ^{165*}
Tailandia	26%	-	Boonmar 2007 ³⁰
Canadá	0%	19%	Thibodeau 2011 ³⁹⁹ y Larkin 2006 ^{210†}
Brasil	-	33.3%	Aquino 2002 ¹⁴
Australia	33.3%	14.8%	Obeng 2012 ²⁷⁵ y Mifflin 2007 ^{254†}
Sudáfrica	68%	-	Jonker 2010 ¹⁹³
Senegal	40.4%	70.8%	Cardinale 2005 ⁵⁰
Etiopía	17.5%	16.6%	Ewnetu 2010 ¹¹¹

Tabla 8. Datos de resistencia a β -lactámicos en *C. jejuni* y *C. coli* aislados de pollo en diferentes países. †: Datos para *C. coli*

Al igual que con la mayoría de antibióticos, se observa variabilidad en los datos dentro de un mismo país. Así, por ejemplo, en dos estudios en Australia en los que se analizaba la susceptibilidad de *C. jejuni* y *C. coli* en aislados obtenidos de granjas de *broilers*, para la especie

C. coli, en el año 2007 se obtuvo un 14.8% de resistencia a β -lactámicos ²⁵⁴ mientras que en el año 2012 se obtuvo un 7% ²⁷⁵.

Generalmente, las resistencias a ampicilina son mayores en cepas aisladas de pollo que en cepas aisladas de cerdo, ya que el consumo de β -lactámicos en pollo es muy superior al de cerdo ²⁴⁴.

Los datos de resistencia a β -lactámicos en cepas de *Campylobacter* aisladas en aves de consumo en España no son numerosos. Los datos disponibles arrojan cifras de un 47.4% y un 42.1% en estudios de 1997-1998 y 2003-2005, respectivamente ^{84,343}, datos similares a los de otros países europeos como Italia o Bélgica. Los únicos datos publicados para *C. coli* aislados a partir de aves de consumo en España arrojaban cifras de un 90% de resistencia frente a ampicilina ³⁴³, resaltando en dicho trabajo cómo esta especie era más resistente a β -lactámicos que *C. jejuni*.

En el estudio llevado a cabo en España durante los años 1997-1998 se encontraba que un 80% de las cepas de *Campylobacter jejuni* estudiadas poseían actividad de tipo β -lactamasa (mediante prueba bioquímica con nitrocefín), mientras que el porcentaje de resistentes a ampicilina no era del 80% sino de un 47.4% ³⁴³. Esta discordancia en los porcentajes, como algunos estudios han sugerido, puede deberse a la presencia de enzimas cuya función original no es la de resistencia frente a β -lactámicos, pero que pueden degradar el nitrocefín. Es decir, que podría haber una cierta producción intrínseca de algunas enzimas con cierta actividad β -lactamasa por parte de *Campylobacter*.

7.2.4. Tetraciclinas

La clortetraciclina es uno de los antibióticos de uso terapéutico más usado en producción de aves de consumo ³⁰⁴, por lo que es de esperar que las tasas de resistencia en las cepas aisladas de aves sean muy elevadas. Sin embargo, al igual que con las quinolonas, los porcentajes de resistencia son muy variables entre países (por ejemplo 0.3% en Islandia ⁴⁰¹ frente a un 100% en China ⁷², Tabla 9) e incluso dentro de un mismo país: En EEUU hay trabajos que informan desde un 48.6% ⁴³⁸ hasta un 99.5% de resistencia ³⁸¹ en cepas aisladas de aves.

En la mayoría de países se ha asociado el incremento de las tasas de resistencia frente a tetraciclinas en cepas de *Campylobacter* aisladas en animales de abasto con el uso intensivo de clortetraciclina y oxitetraciclina en el tratamiento de aves y cerdos: por ejemplo, en Japón, tras tratamiento de aves con oxitetraciclina se encontraron resistencias del 57.1% y 95.2% para *C. jejuni* y *C. coli*, respectivamente, frente a un 43.2% y 74.3% en animales sin tratar ¹⁶, o

en Australia, donde a diferencia de otros antibióticos como las quinolonas, la oxitetraciclina sí ha sido permitida de forma terapéutica en pollos de corral y en cerdo (muy especialmente en estos últimos), lo que explicaría los valores de resistencia en *Campylobacter* para este país: 25.5% en cerdos vs. 14.5% en pollos ²⁷⁵.

País	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	Referencia
España	81.2%	96.7%	Melero 2012 ²⁵⁰ , de Jong 2012 ⁸⁴ †
Holanda	42.1%	-	de Jong 2012 ⁸⁴
Francia	67.4%	96.7%	de Jong 2012 ⁸⁴
Alemania	30%	58.8%	de Jong 2012 ⁸⁴ , Lubert 2003 ²³¹ †
Reino Unido	58.8%	40%	de Jong 2012 ⁸⁴
Irlanda	12%	10.3%	McGill 2006 ²⁴⁶
Polonia	8.3%	10%	Rozynek 2008 ³³⁸
Noruega	1.3%	-	Norström 2007 ²⁷²
Islandia	0.3%	0%	Thorsteinsdottir 2008 ⁴⁰¹
Italia	36.7%	60.9%	Sammarco 2010 ³⁵³
Bélgica	40.8%	76.9%	Mattheus 2012 ²⁴⁴
Suiza	19.1%	-	Kittl 2010 ²⁰⁴
Dinamarca	17%	35%	DANMAP*
Japón	50.4%	50%	Ishihara 2004 ¹⁸³
China	100%	100%	Chen 2010 ⁷²
Corea del Sur	94.3%	95.6%	Hong 2007 ¹⁷⁶
Turquía	76.3%	-	Cokal 2009 ⁵⁶
Tailandia	22%	-	Boonmar 2007 ³⁰
EEUU	48.6%	39.9%	Zhao 2010 ⁴³⁸
Canadá	44%	59%	Thibodeau 2011 ³⁹⁹
Brasil	-	27.8%	Aquino 2002 ¹⁴
Australia	18.4%	14.8%	Mifflin 2007 ²⁵⁴
Nueva Zelanda	0%	-	Pleydell 2010 ³⁰⁸
Sudáfrica	98.2%	-	Jonker 2010 ¹⁹³
Etiopía	13.5%	16.6%	Ewnetu 2010 ¹¹¹

Tabla 9. Datos de resistencia a tetraciclinas en *C. jejuni* y *C. coli* aislados de pollo en diferentes países. †: Datos para *C. coli*. *Datos de DANMAP accesibles en http://www.danmap.org/Downloads/~media/Projekt%20sites/Danmap/DANMAP%20reports/Danmap_2010.ashx

Los valores de resistencia frente a la tetraciclina van a depender por tanto i) de la especie aislada, ya que, *C. coli* suele poseer mayores porcentajes de resistencia ²⁵⁸, y ii) del tipo de producción que se realice, así los pollos de cría intensiva son siempre poseedores de mayores tasas de resistencia, por necesidad de tratamiento terapéutico con más frecuencia que en cría orgánica, donde no se usan los antibióticos ³⁰⁴.

Los tratamientos terapéuticos con clortetraciclina mantenidos en el tiempo pueden producir, teóricamente, una selección de las poblaciones resistentes a tetraciclinas. Sin embargo, en estudios experimentales tras el tratamiento de *broilers* con clortetraciclina se ha comprobado que, por una parte, no aparecen poblaciones resistentes nuevas y que, por otra parte, tras

suspender el tratamiento, las poblaciones resistentes, predominantes al principio, disminuyen de forma drástica y no quedan como población predominante ^{112,304}.

En España, los datos de resistencia a tetraciclina en cepas de *Campylobacter* aisladas a partir de aves de consumo son variables. Así, para *C. jejuni* en el año 2000 se obtenía un porcentaje de resistencia del 31.8% en cepas obtenidas de contenido intestinal de pollos en matadero ³⁴³, mientras que en un estudio del año 2011 con cepas aisladas de pollos criados en granjas orgánicas, el valor era de un 42.1% ²⁸³, porcentajes en ambos casos similares a los observados en otros países europeos. Finalmente, en un estudio del año 2011 en cepas aisladas de canales de pollo en matadero se obtenían valores muy superiores, con un 81.82% de resistencia, agravado con que muchas de las cepas poseían también resistencia frente a ciprofloxacino (72.72% Cip^RTet^R) ²⁵⁰. Para la especie *C. coli* los datos en España son escasos y muy variables, así mientras que en el estudio del año 2000 no se encontraba resistencia a tetraciclina para esta especie ³⁴³, datos de 2003-2005 reflejaban una tasa de resistencia del 93.1% ⁸⁴. Los autores estiman que la variabilidad de datos puede deberse a la expansión de clones resistentes a tetraciclina en las granjas escogidas para el estudio.

7.2.5. Cloranfenicol

Como podemos ver en la tabla 10, no existen muchos datos sobre resistencia a fenicoles en cepas de *Campylobacter* spp. aisladas en aves de consumo. Aún así, con los datos disponibles publicados, podemos observar que las tasas de resistencia a fenicoles son en general muy bajas: por ejemplo, sensibilidad en todas las cepas analizadas en Canadá y Australia. Por el contrario destacan los porcentajes elevados encontrados en dos estudios, llevados a cabo en China ⁷² y en Italia ³⁵³. En el estudio llevado a cabo en China, en cepas aisladas de contenido de ciegos de broilers en matadero, las tasas de resistencia frente a florfenicol son muy elevadas para *C. jejuni* (79.2%), siendo menores para el cloranfenicol (30.7%). Los autores afirman que el florfenicol ha sido utilizado de forma intensiva (a diferencia de otros grupos de antibióticos) como promotor de crecimiento en aves en China hasta el año 2006. Es remarcable como para las cepas de *C. coli* aisladas de aves de consumo, las tasas de resistencia son significativamente menores que para *C. jejuni* (1.9% y 3.8% para florfenicol y cloranfenicol, respectivamente).

En España, los datos disponibles sobre resistencia a cloranfenicol en aves de consumo son escasos, pero podemos citar dos trabajos: Sáenz y colaboradores en el año 2000 ³⁴³ y Oporto y colaboradores en el 2009 ²⁸³. En ambos casos no encontraban resistencia a cloranfenicol en las cepas aisladas independientemente de si la especie era *C. jejuni* o *C. coli*. Estos datos son concordantes con el resto de estudios europeos y en general en todos los países.

El mecanismo molecular de resistencia frente a cloranfenicol se conoce para *C. jejuni* y *C. coli* y es debido a la expresión de un gen denominado *cat* (cloranfenicol acetil transferasa) ⁴¹⁸, el cual se ha detectado en plásmidos de alrededor de 50 Kbs ³⁴⁴ en ambas especies. La baja presión antibiótica haría que la diseminación de estos plásmidos entre las cepas de *Campylobacter* fuese muy limitada.

País	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	Referencia
España	0%	-	Sáenz 2000 ³⁴³
Irlanda	7.8%	7.6%	McGill 2006 ²⁴⁶
Italia	20%	13%	Sammarco 2010 ³⁵³
Dinamarca	0%	-	DANMAP*
China	30.7%	3.8%	Chen 2010 ⁷²
Canadá	0%	-	Thibodeau 2011 ³⁹⁹
Australia	0%	0%	Miflin 2007 ²⁵⁴

Tabla 10. Datos de resistencia a cloranfenicol en *C. jejuni* y *C. coli* aislados de pollo en diferentes países.

*DANMAP.Datos accesibles en http://www.danmap.org/Downloads/~media/Projekt%20sites/Danmap/DANMAP%20reports/Danmap_2010.ashx

7.2.6. Aminoglicósidos

Las tasas de resistencia frente a aminoglicósidos para cepas de *Campylobacter* aisladas en aves de consumo son, en general, muy bajas. La mayoría de estudios arrojan cifras inferiores a un 5% de resistencia para *C. jejuni* ^{84,308,399,401}, salvo algunas excepciones: China 27.2% ⁷² y Bélgica 12.9% ²⁴⁴ de resistencia frente a gentamicina. Para *C. coli* los datos son similares, con muy baja prevalencia de resistencia ^{84,338,353} excepto, de nuevo, en datos de China, donde en el 2010 se encontraban cifras de un 92.3% de resistencia ⁷². Los genes de resistencia a aminoglicósidos han sido detectados en *Campylobacter* localizados principalmente en integrones, transposones y en plásmidos de multiresistencia ^{130,271}. Como ya han demostrado algunos estudios, la presencia de integrones es muy baja en *Campylobacter* ⁴¹⁰, por lo tanto, es de esperar que la resistencia frente a aminoglicósidos sea también muy baja. El porqué de las cifras tan altas en China para *C. coli* aislados en aves de consumo se explicaría por la expansión de clones de *C. coli* que portan una isla genómica que contiene varios genes de resistencia a aminoglicósidos (*aadE*, *sat4*, *aph3*, entre otros) ³¹⁷. Con el uso de aminoglicósidos como la neomicina, amikacina o gentamicina para el tratamiento de infecciones en broilers se habría producido una selección de las cepas resistentes y una posterior expansión de estas ³¹⁷.

Los datos de resistencia en España, frente a gentamicina y otros aminoglicósidos como la kanamicina, para cepas de *Campylobacter* aisladas en aves de consumo son variables y dependientes de la especie estudiada. Así, para *C. jejuni*, las tasas de resistencia oscilan entre

0 y 11.9% ^{283,343}, mientras que son de un 4.55% frente a la estreptomicina, antibiótico de la misma familia. Sin embargo los datos obtenidos por Sáenz y colaboradores en el año 2000 arrojaban un 80% de resistencia para *C. coli* ³⁴³, mientras que datos más recientes indican un valor de resistencia para esta especie del 6.9% ⁸⁴. Por tanto, como vemos, existe variación en los datos en España. Los valores elevados observados en *C. coli* pueden deberse a una expansión clonal de algunas poblaciones resistentes. El uso de apramicina en veterinaria habría causado una selección de cepas que portasen el gen *aac(3')-IV* que confiere resistencia tanto a apramicina como a gentamicina, lo que explicaría los altos valores a finales de los años 90 ³⁴³.

País	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	Referencia
España	11.9%	6.9%	Melero 2012 ²⁵⁰ , de Jong 2012 ⁸⁴ †
Holanda	0%	-	de Jong 2012 ⁸⁴
Francia	0%	0%	de Jong 2012 ⁸⁴
Alemania	0%	0%	de Jong 2012 ⁸⁴ , Lubert 2003 ²³¹ †
Reino Unido	0%	0%	de Jong 2012 ⁸⁴
Polonia	1.7%	0%	Rozynek 2008 ³³⁸
Islandia	0%	0%	Thorsteinsdottir 2008 ⁴⁰¹
Italia	6.7%	4.3%	Sammarco 2010 ³⁵³
Bélgica	12.9%	9.3%	Mattheus 2012 ²⁴⁴
Dinamarca	0%	-	DANMAP*
China	27.2%	92.3%	Chen 2010 ⁷²
EEUU	<1%	-	Zhao 2010 ⁴³⁸
Canadá	0%	-	Thibodeau 2011 ³⁹⁹
Nueva Zelanda	0%	-	Pleydell 2010 ³⁰⁸

Tabla 11. Datos de resistencia a aminoglicósidos en *C. jejuni* y *C. coli* aislados de pollo en diferentes países. †: Datos para *C. coli*. *DANMAP. Datos accesibles en http://www.danmap.org/Downloads/~media/Projekt%20sites/Danmap/DANMAP%20reports/Danmap_2010 .ashx

7.3. Mecanismos moleculares de resistencia en *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*

Conocer los mecanismos moleculares de la resistencia a antimicrobianos en cualquier bacteria es, sin duda, de vital importancia tanto por sus implicaciones clínicas como para la epidemiología de la misma. Los mecanismos por los que se adquiere la resistencia pueden estar codificados en el cromosoma o bien en elementos móviles que pueden ser transmisibles. Esta última posibilidad añade mayor gravedad al problema de la resistencia en bacterias, por la diseminación del correspondiente elemento móvil entre otras cepas de la misma o de otras especies.

Un uso prudente de los antibióticos, tanto en clínica como en terapéutica en animales, junto con el conocimiento sobre los determinantes de resistencia, la composición genética de los

mismos y la relación entre ellos puede ser muy útil para el tratamiento de enfermedades, prevenir diseminación de resistencias y conocer las relaciones entre poblaciones de cepas ⁴²⁹. En muchas especies bacterianas existe una resistencia intrínseca a algunos grupos de antimicrobianos; conocer estos datos es muy importante sobre todo en el tratamiento clínico de infecciones, ya que la suma de resistencia intrínseca más adquirida puede hacer que determinadas cepas patógenas se cronifiquen en los pacientes, haciendo casi imposible el tratamiento de la infección ⁸¹.

Campylobacter spp. posee una resistencia intrínseca frente a determinados grupos de antibióticos como la bacitracina, novobiocina, rifampicina, estreptogramina B, trimetoprim y vancomicina, así como a muchos β -lactámicos ²²⁹. Aunque no totalmente claro, la resistencia podría deberse a mecanismos relacionados con bombas de flujo, porinas o permeabilidad de la membrana externa de *Campylobacter*. Por otra parte, la resistencia intrínseca a estos antibióticos ha permitido también el diseño de medios de cultivo selectivos para diferentes especies del género *Campylobacter*.

7.3.1. Mecanismos moleculares de resistencia a quinolonas en *Campylobacter* spp.

7.3.1.1. Quinolonas

La primera quinolona descubierta, el ácido nalidíxico, fue obtenida como un producto secundario en la síntesis de la cloroquina, un fármaco utilizado para el tratamiento de la malaria ¹³. El ácido nalidíxico pronto se reveló como un agente efectivo en el tratamiento de infecciones urinarias provocadas por bacterias Gram $-$. Posteriormente, la modificación del ácido nalidíxico mediante la adición de un átomo de flúor en la posición 6 de la molécula dio lugar a las quinolonas de segunda generación o fluoroquinolonas, como el norfloxacin. Posteriores modificaciones dieron lugar a la aparición de ciprofloxacino y enrofloxacin, que poseían la ventaja de ser más activos frente a bacterias Gram $+$ y microorganismos atípicos, así como una mejor farmacocinética ^{13,98}.

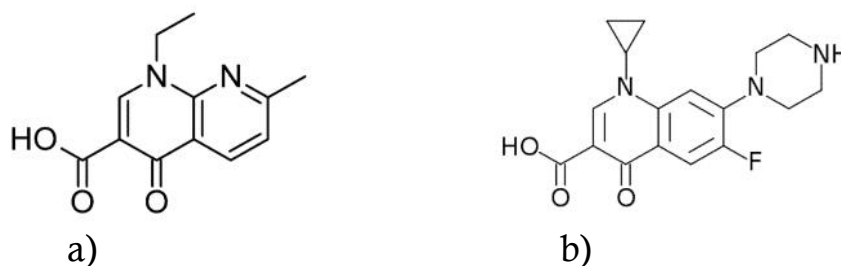


Figura 1: Estructura química del ácido nalidíxico (a) y del ciprofloxacino (b)

Mediante sustituciones en las posiciones 1, 7 y 8 se obtuvo el moxifloxacino y posteriormente el gemifloxacino ⁹⁸. En la actualidad se habla de quinolonas de cuarta generación, sin sustituyente de tipo flúor; como el gatifloxacino, aunque muchas de estas quinolonas están todavía en proceso de desarrollo.

7.3.1.2. Diana de las quinolonas

La ADN Topoisomerasa II (ADN girasa) y la ADN Topoisomerasa IV son dos enzimas bacterianas que intervienen tanto en la replicación como en la transcripción del ADN, así como en la reparación y almacenamiento del material genético. La ADN girasa es una enzima dependiente de ATP que introduce y mantiene el superenrollamiento negativo del ADN durante la replicación, transcripción y recombinación. Para ello es capaz de realizar cortes en la doble hebra de ADN y posteriores uniones en el ADN durante estos procesos.

La ADN Topoisomerasa IV relaja el superenrollamiento positivo y participa de modo activo en la separación de los dos cromosomas originados en la mitosis bacteriana ²¹⁹.

En ambos casos las dos enzimas son heterodímeros formados por cuatro subunidades. En la ADN girasa 2 subunidades tipo A y dos tipo B (codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB*, respectivamente) y en la ADN topoisomerasa IV las cuatro subunidades están codificadas por los genes *parC* y *parE* ⁷.

Las quinolonas van a interaccionar con estas dos enzimas, impidiendo la replicación del ADN, aunque con diferencias, ya que en las bacterias Gram – su objetivo es la ADN girasa y en las bacterias Gram + la Topoisomerasa IV ^{196,332}.

Aunque el mecanismo exacto por el que las quinolonas producen la pérdida de viabilidad de la bacteria no es perfectamente conocido, se teoriza con la posibilidad de que se origine una acumulación de ADN cromosómico fragmentado y de reactivos tóxicos de tipo superóxido. En cualquier caso la acción de las quinolonas es dependiente de su concentración, con un efecto acumulativo ³³².

Dentro de la secuencia de aminoácidos de las girasas o topoisomerasas existe una región denominada QRDR (*Quinolone-resistance Determining Region*) localizada en la zona aminoterminal (entre los aminoácidos 67-106 en bacterias Gram –) de la enzima. Es en los aminoácidos de esta región, que topológicamente se localizan en la superficie de la estructura cuaternaria de la enzima, donde interaccionan las quinolonas, provocando su efecto deletéreo.

Campylobacter spp., al igual que otras especies bacterianas (*Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis* o *Treponema pallidum*, entre otros) carece de genes para la topoisomerasa IV (*parC* y *parE*) ¹⁹ realizando la ADN girasa las funciones de la ADN topoisomerasa IV ^{234,305}.

En *C. jejuni*, el tamaño de la región QRDR en *gyrA* es variable según los distintos autores. Para algunos comprende desde los codones 54 a 126, en una región de 210-220 pares de bases^{201,417} mientras que para otros autores comprende de los codones 38-126³⁰⁵.

7.3.1.3. Mecanismos de resistencia a quinolonas en *Campylobacter* spp.

En las bacterias se conocen diferentes mecanismos de resistencia frente a quinolonas^{7,332,340}, algunos minoritarios como: i) bombas de eflujo que limitan la presencia de la quinolona en el interior de la bacteria, que actúan de forma sinérgica con otros mecanismos, siendo algunas de ellas específicas para quinolonas como NorA en *S. aureus*⁴³⁴, ii) descenso en la expresión de porinas, como se ha observado con la porina OmpF en *E. coli*³⁴⁰ y por tanto de la permeabilidad y entrada de quinolonas en la bacteria, iii) Protección de la ADN girasa o Topoisomerasa IV, mediante proteínas (Qnrs) que compiten con el ADN por la unión a la ADN girasa y Topoisomerasa IV³³², produciendo variaciones de CMI's relativamente modestas²⁴², y iv) modificación enzimática de las quinolonas, como por ejemplo mediante la enzima aminoglicosido acetiltransferasa, codificada por la *aac(6')-Ib-cr*³³¹. Pero de forma mayoritaria, el mecanismo más descrito tanto en bacterias Gram + como Gram –son las mutaciones en los genes responsables de las subunidades A de las enzimas ADN girasa o ADN topoisomerasa IV³⁴⁰ (*gyrA* y *parC*). Principalmente, las mutaciones se concentran en un codón de la región QRDR del gen *gyrA*, el codón 83 en *E. coli*³⁴⁰ (Ser83Leu es la más frecuente¹⁹). Esta mutación se ha descrito también en otras especies como *Shigella* spp., *Citrobacter freundii* o en otras tan alejadas filogenéticamente como *Neisseria gonorrhoeae* o *Acinetobacter baumannii*⁴¹⁵.

La resistencia a quinolonas en *Campylobacter* spp. se origina principalmente por las mutaciones que afectan a la región QRDR del gen *gyrA*. Se han descrito varias, siendo la más frecuente una sustitución en el aminoácido 86 (Thr86Ile), es decir sustitución de Treonina por Isoleucina, debido a una transición C - T. La mayoría de estudios indican que esta mutación confiere *per se* una alta resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas^{7,128,201,417} siendo equivalente a la mutación Ser83Leu en *E. coli*.

En la tabla 12 se resumen las mutaciones encontradas en la región QRDR de *Campylobacter*. Como vemos, se han descrito también otras mutaciones en el codón 86, como Thr86Ala, Thr86Lis o Thr86Val que podrían proporcionar diferentes fenotipos de resistencia a quinolonas.

Según algún autor, todas aquellas mutaciones en el codón 86 distintas a Thr86Ile aparecen generalmente mediante generación de mutantes en laboratorio¹⁹. Otras mutaciones en

codones diferentes no suelen aparecer de manera única, sino que acompañarían a la más habitual (Thr86Ile), como es el caso de Pro104Ser¹⁸⁸.

Fuera de la zona QRDR existen mutaciones y polimorfismos cuya influencia en la resistencia a quinolonas en *Campylobacter* es difícil de evaluar. Algunas como Ser22Gly, Asn203Ser o Ala206Thr podrían tener cierta influencia en la resistencia a quinolonas¹²⁸, aunque estudios más recientes las descartan, describiéndolas también en cepas sensibles a quinolonas¹⁸⁸.

En el caso del gen *gyrB*, de entre los polimorfismos descritos, no hay ninguno que parezca conferir algún tipo de resistencia a quinolonas en *Campylobacter*²⁹².

Gen diana	Mutaciones	Observaciones	Referencia
<i>gyrA</i>	Ser22Gly		Ge 2003 ¹²⁸
	Ala70Thr		Wang 1993 ⁴¹⁷
	Thr86Ile	La más numerosa, proporciona una alta CMI a quinolonas y fluoroquinolonas	Wang 1993 ⁴¹⁷
	Thr86Ala	Confiere una alta resistencia a Ácido Nalidíxico y una baja resistencia a Ciprofloxacino	Wang 1993 ⁴¹⁷
	Thr86Lys		Wang 1993 ⁴¹⁷
	Thr86Val		Piddock 2003 ³⁰⁵
	Ala87Pro		Bachoual 2001 ¹⁹
	Asp90His		Bachoual 2001 ¹⁹
	Asp90Tyr		Bachoual 2001 ¹⁹
	Asp90Asn		Ge 2005 ¹²⁷
	Pro104Ser		Ge 2005 ¹²⁷
	Val106Ile		Piddock 2003 ³⁰⁵
	Val149Ile		Ge 2003 ¹²⁸
	Asn203Ser		Ge 2003 ¹²⁸
	Ala206Thr		Ge 2003 ¹²⁸

Tabla 12. Tabla resumen con las principales mutaciones encontradas en el gen *gyrA* en *Campylobacter* spp.

Se han descrito cepas con un perfil atípico de resistencia como NalS/CipR (sensible a ácido nalidíxico y resistente a ciprofloxacino). En el caso de *E. coli* se enumeran varias posibilidades, como serían la mutación Gly81Cys que haría que las diferentes quinolonas se unieran mejor o peor a la zona QRDR⁴⁶, o bien en el caso de cepas NalS/OfloR (ofloxacino) debido a una doble mutación (Gly81Asp en *gyrA* y Ser80Arg en *parC*)⁵². En *Campylobacter* spp. se han descrito cepas con perfiles similares, aunque las causas de este fenotipo no están determinadas. Se especula con que la causa real podría deberse a alguna alteración de

bombas de eflujo o a alguna mutación fuera de la zona QRDR que alterase la conformación final de la ADN girasa ¹⁹.

Pese a que la mutación Thr86Ile parece conferir una resistencia muy elevada frente a quinolonas, hay diferentes estudios que encuentran variaciones en los valores de CMI, por lo que habría otros mecanismos que modularían la resistencia a quinolonas en combinación con la mutación Thr86Ile. Para Jesse y colaboradores ¹⁸⁸, la mutación Thr86Ile conferiría por sí sola CMIs ≥ 4 mg/L para ciprofloxacino y ≥ 32 mg/L para ácido nalidíxico, y sin embargo, generalmente se alcanzan CMIs muy superiores para esas quinolonas.

Uno de los mecanismos que se apuntan como causante de este aumento en la CMI para las quinolonas es la presencia o sobreexpresión de bombas de eflujo. Al ser el efecto de las quinolonas de tipo acumulativo, la presencia de alguna bomba de eflujo que expulsa las quinolonas (y otros compuestos tóxicos para la bacteria) haría que el valor de CMI aumentase en varios órdenes de magnitud. En el caso de *Campylobacter jejuni* dos bombas parecen tener influencia en relación con la resistencia a antibióticos: CmeABC y CmeDEF ¹²⁷, ambas de tipo RND (*resistance/ nodulation/ cell division*).

Según algún autor ³¹⁶ la relación entre las bombas de eflujo CmeABC y CmeDEF y las mutaciones en *gyrA* serían:

- CMIs entre 2 y 32 mg/L: sin mutaciones en el gen *gyrA* y posiblemente sobreexpresión de las bombas de eflujo CmeABC o CmeDEF. Es decir, podría haber resistencia a quinolonas sin mutaciones en *gyrA*.
- CMIs entre 8 y 64 mg/L: mutaciones en *gyrA*. Niveles de expresión normales de CmeABC o CmeDEF
- CMIs entre 64-128 mg/L : mutaciones en *gyrA* y sobreexpresión de CmeABC o CmeDEF

Por tanto, el valor final de CMI para las quinolonas en las especies del género *Campylobacter* vendría definido principalmente por las mutaciones en *gyrA* y estaría modulado por mutaciones fuera de la zona QRDR, las bombas de eflujo o incluso mutaciones en otros genes ³⁰⁵. Por otra parte, no se ha descrito en la literatura científica ningún gen *qnr* ni enzimas como la AAC(6')-Ib-cr (aminoglicosido acetiltransferasa) con influencia en la resistencia a quinolonas en *Campylobacter* spp.

7.3.2. Mecanismos moleculares de resistencia a macrólidos en *Campylobacter* spp.

7.3.2.1. Macrólidos

Los macrólidos son compuestos que se caracterizan por tener un anillo macrocíclico de tipo lactona, al cual se le unen varios deoxiazúcares como la cladinosa o la desosamina. De forma clásica este anillo puede estar constituido por 14 átomos de carbono como en la eritromicina o de 15 o 16 átomos de carbono como la azitromicina o espiramicina ³⁸⁵.

El primer macrólido descrito, la eritromicina, fue descubierto en 1952 a partir de cepas de *Saccharopolyspora erythraea* (*Streptomyces erythraeus* en la época en que se descubrió el antibiótico). Al revelarse este compuesto como inestable en medio ácido, pronto surgieron derivados semisintéticos con mejores características farmacocinéticas y farmacodinámicas, así como con un espectro de acción más amplio.

De entre los derivados de la eritromicina podemos enumerar ⁴³⁷:

- Anillo lactona con 14 átomos de carbono: claritromicina, roxitromicina, así como los ketólidos (telitromicina) y fluoroketólidos
- Anillo lactona con 15 átomos de carbono: azitromicina
- Anillo lactona con 16 átomos de carbono: espiramicina y josamicina

De forma general se suelen englobar los macrólidos junto con otros antibióticos en lo que se denomina grupo MLKSO (Macrólidos-Lincosamidas-Ketólidos-Streptogramina-Oxazolidinona), ya que todos ellos actúan uniéndose a sitios comunes en la subunidad 50S del ribosoma bacteriano ³³⁰. De entre las lincosamidas podemos enumerar a la clindamicina y a la lincomicina, y dentro de las oxazolidinonas al linezolid. Aunque todos estos antibióticos del grupo MLSKO tienen un modo de acción similar, se van a diferenciar por cómo se ven afectados por los diferentes mecanismos de resistencia en las bacterias, por ejemplo el linezolid se ve afectado por la acción de los genes *erm*, que metilan el ARNr 23S ⁴⁰³.

7.3.2.2. Modo de acción de los macrólidos

Durante la síntesis proteica en las bacterias, los péptidos sintetizados deben atravesar una estructura en forma de túnel que se encuentra en la subunidad 50S del ribosoma. Esta estructura está constituida por zonas del RNA (regiones V) y hélices Beta de dos proteínas ribosómicas: L4 y L22. El péptido recién sintetizado debe atravesar este túnel, y es ahí donde actúan los macrólidos, impidiendo su salida del ribosoma. La forma de hacerlo en *E. coli* es mediante la unión del macrólido a una Adenina de la posición 2058 del ARNr 23S ³⁹⁵.

Según sea la estructura de la molécula dentro del grupo MLKSO, el antibiótico va a dejar más o menos espacio físico para el paso de los péptidos sintetizados. Los efectos pueden ser

- Inhiben la translocación del ribosoma bacteriano
- Separación del complejo peptidil-ARNt del ribosoma
- Previenen la elongación de la cadena polipeptídica.

Son, por tanto, efectos bacteriostáticos, aunque en algunos microorganismos puede tener también efectos bactericidas, según dosis del antibiótico.

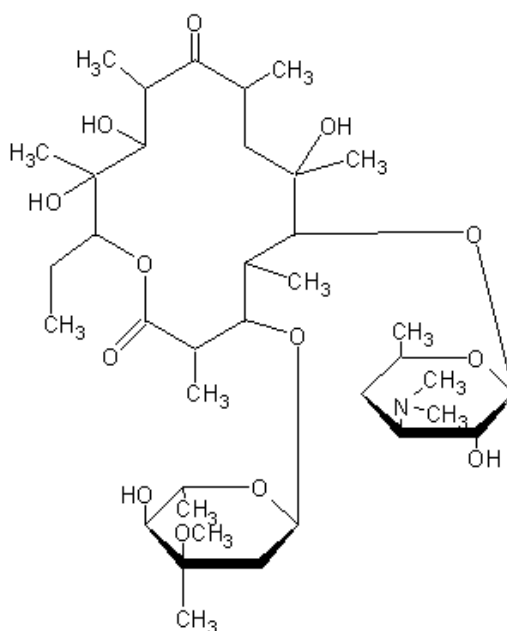


Figura 2: Estructura química de la eritromicina

7.3.2.3. Mecanismos de resistencia a Macrólidos en *Campylobacter jejuni* y *C. coli*

Se han descrito diferentes mecanismos de resistencia frente a macrólidos en multitud de grupos bacterianos. Algunos de estos mecanismos se basan en la metilación del ARNr 23S (genes *erm*), actuando sobre una adenina en la posición 2058 (nomenclatura de *E. coli*), impidiendo la unión del macrólido¹³¹. Otros modifican e inactivan al propio macrólido, por medio de fosfotransferasas, liasas, esterasas, etc³³⁰, codificadas bien en cromosoma o en plásmido. De igual modo se han descrito bombas de eflujo tanto selectivas del grupo MLSKO (como las codificadas por *msr* o *mefA*), como inespecíficas³³⁰.

En el género *Campylobacter* spp. no se han encontrado enzimas modificadoras del 23S ARNr o enzimas inactivadoras de los antibióticos ¹²⁹. Los principales mecanismos que confieren resistencia a macrólidos son las mutaciones en las posiciones 2074 y 2075 (región V) del gen *rrn*, que codifica para el ARNr 23S ^{63,129,215,230}. Otros mecanismos descritos son mutaciones en los genes *rpID* y *rpIV* (proteínas ribosómicas L4 y L22) así, como alteraciones en la expresión de bombas de eflujo inespecíficas (CmeABC). A diferencia de la resistencia a quinolonas, la frecuencia de aparición de mutaciones que conducen a la resistencia frente a macrólidos se ha demostrado que es 10000 veces inferior. Además, los mutantes resistentes a macrólidos obtenidos en laboratorio tienden a poseer valores de CMI de entre 8-64 mg/L, que son valores de resistencia baja o intermedia. Para obtener CMIs mayores se necesitan concentraciones altas de macrólidos durante tiempo prolongado ²²⁹. Con más detalle, los mecanismos descritos en *Campylobacter* son:

- Mutaciones en el gen *rrn* (ARNr 23S)

En *Campylobacter* spp. existen tres copias del gen *rrn* y las mutaciones pueden aparecer en 1, 2 o en las tres copias del gen ¹²⁹. Es sin duda el mecanismo más comúnmente descrito y el que confiere unos valores mayores de CMI frente a macrólidos en *Campylobacter* ^{63,129,131}, por lo general superiores a 128 mg/L. La mutación que con más frecuencia se describe es la transversión A2075G (corresponde con A2059G en *E. coli*) ^{131,215}. Otras mutaciones que también confieren resistencia son A2074C y A2074G. Se cree que la mutación A2074C es menos frecuente quizás porque altera el ribosoma estructuralmente de forma más drástica que A2075G, haciendo que la viabilidad de *Campylobacter* sea menor ¹²⁹.

Aunque no está clara la relación entre el número de copias del gen que poseen mutaciones y el valor de CMI frente a los macrólidos ^{186,291}, algunos autores afirman que al menos 2 de las 3 copias deben estar mutadas para conferir valores altos de CMI (>128 mg/L) ^{129,291}. Por lo general los estudios encuentran las mutaciones en homocigosis, es decir, en la mayoría de cepas de *C. jejuni* o *C. coli* estudiadas resistentes a macrólidos, las 3 copias poseen alguna mutación en la región V del ARNr 23S: 93% (3/3 copias) frente a un 7% (2/3 copias) ²¹⁵.

- Mutaciones en los genes *rpID* y *rpIV* (L4 y L22)

Las mutaciones que afecten a zonas de las proteínas L4 y L22 que conformen junto con el ARNr 23S, el túnel de salida de los péptidos sintetizados en el ribosoma serán las que influyan en la resistencia a macrólidos. En *Campylobacter* estas zonas son:

- i) L4 (*rpID*): Aminoácidos 55 a 77 ¹⁶².
- ii) L22 (*rpIV*): Aminoácidos 109 a 142. A diferencia de L4 aquí se encuentran muchos polimorfismos, aunque la característica necesaria es que la longitud de la

β -hélice sea constante para la formación del túnel de salida ⁸⁰. De ahí una mayor influencia de las inserciones/deleciones que de las mutaciones puntuales.

Inicialmente se describieron las mutaciones Gly74Asp en L4 y las inserciones ins₉₈Thr-Ser-His y ins₈₆Ala-Arg-Ala-Arg (duplicación en tándem) en L22 que eran capaces de conferir resistencia a macrólidos ⁴¹. Se obtuvieron mediante pases de cepas en concentraciones cada vez mayores de eritromicina y tilosina.

Posteriormente se han encontrado otras mutaciones en L4: Gly57Asp y Gly57Val que confieren junto con Gly74Asp un alto valor de CMI (256 mg/L), por lo que tendrían un efecto sinérgico ⁴². Otros autores han descrito mutaciones como Asp72Asn y la inserción ins₇₃Gly-Ala-Val-Leu-Thr en L22 (en cepas obtenidas de pacientes, no por mutaciones inducidas en laboratorio) y que serían capaces de conferir altos valores de resistencia por sí mismas a eritromicina ²¹⁵. En contraposición a esta idea algún trabajo sugiere que la aparición de mutaciones en L4 y L22 confieren por sí solas una baja resistencia a macrólidos, que tendría como consecuencia la prevención de aparición de cepas mutantes en el gen *rrn* (cepas con alta resistencia a macrólidos ⁴²). Los valores de alta resistencia provendrían de la sinergia con otros mecanismos, como las bombas de eflujo ^{41,42}.

- Bomba de eflujo CmeABC

La bomba de eflujo CmeABC es la más estudiada dentro de las 14 posibles que puede tener *C. jejuni* ¹⁸⁷. Actúa de modo inespecífico, pero parece tener un mayor efecto sobre la resistencia a macrólidos que frente a quinolonas ²⁹¹.

Las evidencias de que CmeABC podría influir en la resistencia frente a macrólidos se encuentran en los experimentos con inhibidores de dicha bomba, como es el PA N (Phe-Arg- -Naftilamida). En todos los casos, la inhibición hace que la CMI frente a macrólidos se reduzca, aunque con diferencias ^{63,215,291}, ya que en las cepas con baja resistencia o intermedia se consigue restaurar la susceptibilidad, mientras que en las cepas con alta resistencia no se consigue restaurar la sensibilidad al antibiótico (por ejemplo descenso de 512 mg/L a 128 mg/L). Sin embargo, algunos autores apuntan a que el efecto puede ser dependiente de la cepa y no es aplicable de forma general ¹²⁹.

Por otra parte, como hemos comentado, CmeABC puede actuar de forma sinérgica a las mutaciones en L4 y L22 para conferir un alto nivel de resistencia a macrólidos ^{41,42}.

7.3.3. Diferencias en el comportamiento de las poblaciones resistentes a quinolonas y macrólidos en cepas de *Campylobacter* spp. aisladas de aves

Como ya se ha comentado, los niveles de resistencia en quinolonas se mantienen muy elevados en la mayoría de países, mientras que los de macrólidos suelen ser en general muy bajos en aquellas cepas aisladas a partir de aves. Se estima que estas diferencias pueden ser debidas más que al diferente uso de ambos antibióticos en terapéutica, al diferente coste biológico que tiene conservar ambas resistencias. El coste biológico se puede definir como lo que supone para una bacteria el mantenimiento de mutaciones cromosómicas, que pese a conferir resistencia al factor externo, hace que las cepas tengan menor tasa de crecimiento o bien menor capacidad de colonización y adaptación al hospedador natural de la bacteria.

A veces la bacteria posee otras mutaciones compensatorias que consiguen reducir el coste biológico o incluso algunas mutaciones hacen que el coste biológico sea inferior al de la cepa sin mutación ¹². Este fenómeno es el que se estima que ocurre en *Campylobacter* con las mutaciones que confieren resistencia a quinolonas a diferencia de la resistencia a macrólidos.

Algunos estudios realizados en laboratorio postulan que las cepas EryR (resistentes a eritromicina) tendrían una tasa de crecimiento menor que las EryS (sensibles a eritromicina) y de ahí que, en ausencia de presión antibiótica no pudieran competir con éstas a la hora de colonizar a las aves. Otros estudios, en cambio, desmienten este hecho ^{161,223,230}, las poblaciones EryS y EryR tendrían tasas de crecimiento similares y colonizarían en niveles similares a las aves.

Aún así, mediante cepas isogénicas EryR y EryS, se observa como las EryS sobrepasan a las EryR en ausencia de presión antibiótica. Ambas pueden colonizar de igual modo al ave, pero las poblaciones sensibles terminan desplazando a la población resistente original, o bien las resistentes son incapaces de colonizar cuando ya existe una población sensible a macrólidos ²³⁰. Por tanto, aún con una tasa de crecimiento similar, las mutantes son menos adaptativas.

El comportamiento de las cepas de *Campylobacter* resistentes a quinolonas es completamente diferente. En ausencia de presión antibiótica, y con cepas isogénicas CipR y CipS, las cepas mutantes en la ADN girasa (Thr86Ile) son capaces de desplazar a poblaciones de cepas sensibles a quinolonas en el intestino de la aves ²³³ y de persistir sin que exista una reversión de la mutación. El mecanismo por el que se produce este fenómeno es desconocido ²³³. De igual modo que en las EryR/EryS la capacidad de

colonización y la tasa de crecimiento es similar en ambas poblaciones (CipR/CipS), pero el comportamiento de las cepas mutantes es totalmente opuesto.

El coste biológico de las mutaciones va a estar modulado por el uso o no de antimicrobianos en la granja, de las posibles mutaciones compensatorias que aparezcan y de factores ambientales o de otras poblaciones bacterianas que interaccionen con las mutantes ²³⁰.

7.3.4. Mecanismos moleculares de resistencia frente a tetraciclinas en *Campylobacter* spp.

7.3.4.1. Tetraciclinas

Las tetraciclinas fueron descubiertas en los años 40 como metabolitos secundarios producidos por bacterias actinomicetes, presentes en el suelo. Su ventaja principal era su amplio espectro sin necesidad de modificaciones secundarias ³⁹⁷. Todas las tetraciclinas descubiertas inicialmente (tetraciclinas de primera generación: tetraciclina, oxitetraciclina y clortetraciclina) tienen una estructura semejante con un sistema de cuatro anillos (núcleo tetracíclico, de donde toman su nombre), denominado naftacenocarboxamida policíclica (Figura 3). Su uso extensivo en agricultura y medicina tuvo como consecuencia la aparición temprana, en 1953, de resistencias en cepas de bacterias patógenas para el hombre ³²⁹.

En los años 60 surgieron las tetraciclinas de segunda generación: minociclina y doxiciclina, con sustituciones en algunas posiciones de los anillos.

El uso de las tetraciclinas decayó con la aparición de las fluoroquinolonas, también con un amplio espectro de acción. Finalmente en los años 90 surgieron las tetraciclinas de tercera generación, como las glicilciclina y tigeciclina, que poseen la ventaja de no verse afectadas por mecanismos de resistencia del tipo de bombas de eflujo.

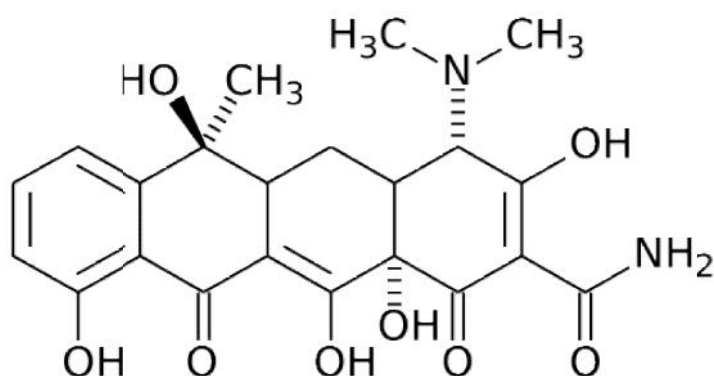


Figura 3: Estructura química de la tetraciclina, mostrando el sistema de 4 anillos naftacenocarboxamida policíclico.

7.3.4.2. Modos de acción de las tetraciclinas

Las tetraciclinas son moléculas antimicrobianas de tipo bacteriostático, ya que impiden la síntesis de proteínas. Para actuar necesitan atravesar porinas de la bacteria unidas a un ión Mg^{2+} . Una vez en el interior de la bacteria van a poder unirse a diferentes zonas del ribosoma bacteriano, pero la clave es que la unión se produzca en el sitio A de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. Para esta unión requieren también del ión Mg^{2+} . El sitio A del ribosoma es el denominado “*tRNA acceptor site*”, que es el sitio de entrada de los ARN de transferencia unidos a un aminoácido.

7.3.4.3. Resistencia a tetraciclinas en *Campylobacter* spp.

Los principales mecanismos de resistencia a tetraciclinas que se pueden encontrar en las bacterias se basan en bombas de eflujo, codificadas bien en cromosoma (la mayoría) como en plásmidos, y en la síntesis de proteínas protectoras del ribosoma (PPR), que se unen al ribosoma, dificultando la unión de las tetraciclinas ⁶⁰, siendo dentro de estas últimas TetM y TetO las más prevalentes ³⁹⁷. Existen otros mecanismos minoritarios como mutaciones en el ADNr 16S ⁷⁸, reducción de la permeabilidad de la bacteria o enzimas modificadoras de las tetraciclinas (hidroxilasa, fosforibosiltransferasa o una oxidoreductasa) ⁹².

En el género *Campylobacter*, el mecanismo descrito como responsable de la resistencia a tetraciclina es de tipo PPR (TetO). La descripción del gen *tetO*, que codifica para dicha PPR fue posterior a la localización física del mismo. Inicialmente, se descubrió que la resistencia frente a la tetraciclina en *Campylobacter* estaba alojada en un plásmido de tipo conjugativo ³⁹². La detección de *tetO* fue posterior, mediante hibridación con sondas en plásmidos de resistencia en *C. coli* ²⁴⁰. Posteriormente se pudo constatar que el gen *tetO* podía encontrarse tanto en plásmidos conjugativos como en plásmidos no movilizables e incluso integrado en el cromosoma ^{17,213,311}, sin que parezca existir relación entre el valor de CMI frente a tetraciclina y la localización de *tetO*.

Esta capacidad de aparecer en plásmidos de tipo conjugativo permitiría una transferencia de la resistencia entre distintas cepas de *Campylobacter* que compartieran un hospedador común. Esta transferencia puede ser rápida, de hecho, en infecciones experimentales en pollos con *C. jejuni* se observa que la transferencia de resistencia a tetraciclina se produce en un periodo de 4 días ¹⁷.

La presencia del gen *tetO* puede conducir a variedad de CMIs frente a tetraciclina. No se ha encontrado una asociación de polimorfismos en la secuencia del gen con valores de CMI ³⁰⁴.

Como podemos observar en la tabla 13, los porcentajes de cepas que poseen el gen *tetO* en plásmido son variables, aunque en general altos (>60%), independientemente de la especie (*C. jejuni* o *C. coli*) y del origen de la cepa. La única excepción es en un estudio llevado a cabo en Australia con cepas de origen aviar y humano, donde *tetO* se localizaba en plásmidos en un 32.3% de las cepas, porcentaje claramente inferior al del resto de estudios.

Porcentaje de <i>tetO</i> en plásmido (%)	Especie	Origen de las cepas	País
87%	<i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i>	Aviar	Taiwan ²¹³
67%	<i>C. jejuni</i>	Clínico	Canadá ¹³²
94%	<i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i>	Clínico	Polonia ⁴¹⁹
90%	<i>C. jejuni</i>	Clínico	Reino Unido ¹²¹
32.3%	<i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i>	Aviar/Clínico	Australia ³¹¹

Tabla 13. Porcentajes de *tetO* en plásmido según diferentes estudios con cepas de origen humano o animal

La presencia de plásmidos de resistencia a tetraciclina que no son movilizables (no pueden conjugarse) han sido descritos por varios autores ^{18,213,311}. Varios mecanismos podrían explicarlo: tipo de hospedador, grupos de incompatibilidad de plásmidos, incapacidad para replicarse tras la conjugación, especificidad de la cepa receptora/donadora y sistemas de restricción/modificación en la cepa receptora ³¹¹.

En cuanto a las características de los plásmidos de resistencia a tetraciclina en *Campylobacter*, en todos ellos se encuentra una sorprendente homogeneidad en cuanto a tamaño y contenido génico. La mayoría de estudios señalan que se encuentran en un rango de tamaño entre 30-58 Kb ^{7,311}. Los dos plásmidos más estudiados son pTet en *C. jejuni* y pCC31 en *C. coli*; ambos, pese a haberse aislado en continentes diferentes y con 20 años de diferencia, además de en especies diferentes, poseen más de un 94% de homología en sus secuencias de ADN ²⁴.

Aunque la mayoría de plásmidos estudiados son más semejantes a pCC31 que a pTet, se suele hablar de un grupo de plásmidos pTet/pCC31-like, es decir, plásmidos que conservan una estructura y ordenación génica muy similar ¹²¹. El plásmido de resistencia a tetraciclina (pTet-pCC31-like) es muy estable en poblaciones de *Campylobacter* incluso sin presión selectiva por uso de tetraciclinas, por lo que es de suponer que debe proporcionar algún tipo de ventaja evolutiva a las cepas que lo portan. Se teoriza con que sea un modo de adaptación de *Campylobacter* a condiciones ambientales adversas, ya que una alta capacidad de conjugación permitiría el intercambio de diferentes genes (no solo de *tetO*) con otras bacterias de forma rápida y efectiva ¹²¹.

Aunque parece que de forma menos frecuente, el gen *tetO* también puede estar localizado en el cromosoma. La recombinación e integración del plásmido o de partes del plásmido se ha demostrado por varios autores ^{31,311,321}. De hecho, en el plásmido pTet existen zonas de recombinación posibles con zonas del cromosoma (secuencias homólogas), así como elementos de inserción como IS607* ¹²⁰.

A diferencia de otras especies, no se han descrito bombas de eflujo selectivas para tetraciclinas. Sin embargo la bomba de eflujo CmeABC, al igual que para quinolonas y macrólidos, parece tener efecto en la modulación de la CMI final a la tetraciclina. Así, se observa que mediante inactivación del gen *cmeB* que forma parte del operón *cmeABC*, la CMI de la tetraciclina disminuye varias diluciones ³⁰⁴. La sobreexpresión de CmeABC puede inducir la resistencia frente a tetraciclina en cepas que no disponen del gen *tetO*, aunque no se observan CMIs tan elevadas como las obtenidas siempre que existe presencia de *tetO*.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS DE LA TESIS



"Para el biólogo, el ideal supremo consiste en resolver el
enigma del propio yo"

Ramón y Cajal

Justificación del estudio

Las campilobacteriosis son consideradas como la principal causa de gastroenteritis bacteriana en la mayoría de países, con incidencias de 46,1 casos por 100000 habitantes en Europa ³⁰⁶, o tan elevados como hasta 100-200 casos por 100000 habitantes en Australia ¹⁵³. Incluso con estas cifras, se cree que los datos están infraestimados, siendo el número real de casos mucho mayor (ver apartado 5.2 Infraestimación de datos).

Este elevado número de casos de campilobacteriosis a nivel mundial provoca grandes pérdidas económicas tanto en gastos de hospitalización como en horas perdidas de trabajo. Estas cifras se han llegado a cuantificar en Europa de hasta 30 millones de euros al año ⁹⁹.

Aunque como ya se ha comentado deben existir diferentes fuentes de infección que expliquen la epidemiología de las campilobacteriosis en el hombre, sin duda, la principal es el consumo o manejo de carne de pollo contaminada por la bacteria. Esto se ha evidenciado tanto por pruebas directas (comparación de genotipos entre cepas clínicas y cepas procedentes de alimentos) como indirectas (descenso significativo del número de campilobacteriosis como consecuencia de la prohibición de consumo de pollo en Bélgica en el año 1999).

Diferentes estudios han mostrado que la eliminación de *Campylobacter* en mataderos y plantas de procesamiento de carne de pollo es poco eficaz como estrategia de control de esta bacteria en la cadena de producción de carne de pollo. Por tanto, se aconseja actuar en pasos anteriores en esta cadena de producción, intentando conseguir que lleguen lotes de aves libres de *Campylobacter* a los mataderos. El panel de Peligros biológicos (BIOHAZ) de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, EFSA (*European Food Safety Authority*), emitió un informe científico sobre *Campylobacter* en la producción de carne de pollo a petición de la Comisión Europea, en el cual se estimaba que reduciendo la prevalencia entre lotes de aves entre un 5-25% se conseguiría una reducción del riesgo para la Salud Pública del 50-90%.

Por otra parte, la Unión Europea estableció en la Regulación (EC) No 2160/2003 para el control de *Salmonella* y otros agentes zoonóticos transmitidos por alimentos, el objetivo de reducir la prevalencia de *Campylobacter* a nivel de producción primaria y, donde fuese apropiado, en las siguientes etapas de la cadena alimentaria. Sin embargo, las medidas aplicadas con éxito para prevenir la presencia de *Salmonella* en los lotes de aves dentro de las granjas se han mostrado generalmente poco eficaces para *Campylobacter*. Esto, como ya se ha comentado, refleja las diferencias en la fisiología, ecología y en la epidemiología entre ambos microorganismos ²⁶⁶. Por tanto, con el objetivo de obtener lotes de aves libres de

Campylobacter, necesitamos no solo conocer las prevalencias y las especies que encontramos en las aves, sino también disponer de un buen conocimiento de la dinámica de las poblaciones de *Campylobacter* en las granjas avícolas. Es decir, conocer la fuente de colonización en granjas, como se comportan las poblaciones de bacteria una vez ha colonizado las aves, si existen poblaciones de *Campylobacter* persistentes o por el contrario son transitorias en las aves, o si las poblaciones de *Campylobacter* desaparecen de la granja cuando desaparece el lote de aves o bien permanecen de alguna forma en el ambiente de la misma.

Otro aspecto importante a considerar, como se ha comentado en la introducción, es el uso de antibióticos en veterinaria, bien de forma terapéutica, preventiva, o incluso como promotores de crecimiento en animales de abasto (aunque esta forma de utilización está prohibida en la UE). Un mal uso de los antibióticos en producción animal, aunque también, lógicamente en clínica, puede conseguir la aparición de poblaciones de bacterias resistentes a esas drogas. Este peligro se vuelve más evidente en el caso de bacterias zoonóticas como *Campylobacter jejuni* y *C. coli*, que pueden causar infección en el hombre. Además, estas bacterias pueden contribuir a mantener o perpetuar un reservorio de genes de resistencia en su nicho ecológico, pudiendo compartir genes de resistencia a antibióticos por medio de transferencia horizontal de estos genes con otras bacterias.

En el caso de la producción intensiva de *broilers* (variedad de pollo desarrollada específicamente para la producción de carne), las instalaciones donde se crían contienen lotes con miles de animales, por lo que la administración (terapéutica o no) de antibióticos se lleva a cabo en la comida o en el agua de bebida. Esto constituye un riesgo por la ingestión de dosis diferentes por parte de cada animal y también porque se estima que hasta un 75% de los antibióticos administrados no son absorbidos por los animales, siendo eliminados en sus excretas. Éstas pueden contaminar el agua, suelo y plantas, entrando en contacto con el hombre ²²⁸.

Por tanto, con todos los antecedentes ya comentados y desde un punto de vista de Salud Pública, la contaminación de carne de pollo por *Campylobacter* (principalmente *C. jejuni* y en menor medida *C. coli*) acarrea dos problemas importantes:

1. La alta prevalencia de *Campylobacter* en la carne de pollo que llega al consumidor, tanto en número de aves dentro de un lote, como el número de lotes contaminados que llegan a matadero (aunque con cifras variables, hasta un 60% de la carne de pollo en el mercado estaría contaminada por *Campylobacter*).
2. La presencia en el pollo de engorde de poblaciones de *Campylobacter* resistentes a los antimicrobianos usados en medicina humana, que puede ocasionar dificultad en el tratamiento de las campilobacteriosis o incluso fallo terapéutico.

Este estudio se ha planteado y organizado en base a estos dos problemas de Salud Pública, cada uno en un capítulo:

CAPÍTULO I: Estudio de *Campylobacter* en cepas de origen aviar y sus implicaciones en las campilobacteriosis humanas

CAPÍTULO II: Estudio de las resistencias a antimicrobianos de las cepas de *Campylobacter* de origen aviar en España. Relación con resistencia a macrólidos en las cepas de origen humano.

Para abordar este trabajo se ha contado con la posibilidad de estudiar granjas españolas de dos etapas previas a la producción de broilers. Son las denominadas “*grandparent breeder farms*” y “*parent breeder farms*”, esta denominación se debe a que estas etapas constituyen las abuelas y madres reproductoras, respectivamente, de los broilers que se comercializan como pollo de carne. La producción comercial de carne de pollo se explica con más detalle en el anexo I y en las figuras 5 y 6.

Las granjas de este estudio poseen tres características interesantes que las hacen muy útiles para la investigación de los dos problemas que se abordan en esta Tesis:

- a. Distribución de las granjas: las granjas de abuelas reproductoras se encuentran todas en la misma provincia, situada en la zona central de España y separadas por pocos kilómetros unas de otras. Las granjas de reproductoras (madres) se encuentran distribuidas por diferentes provincias, excepto en la provincia donde se encuentran las granjas de abuelas. Por tanto, con ambas etapas de producción se cubriría la geografía española, lo cual indica que los datos obtenidos proporcionarían una buena medida de la tendencia general en España.
- b. Bioseguridad: las granjas de abuelas poseen medidas de bioseguridad que teóricamente deberían limitar la entrada de patógenos externos a la granja, lo que debería facilitar el estudio de las fuentes de infección.
- c. Trazabilidad de lotes: cada lote de aves posee un código que lo identifica y en todo momento se conocen los lotes y granjas de origen de las aves que se muestrearon. Así pues, se puede hacer un seguimiento de las poblaciones de *Campylobacter* dentro del lote de aves.

Anexo I. Producción comercial de carne de pollo. Granjas del estudio.

Durante los últimos 50 años, la continua selección genética de las razas de aves de consumo ha hecho que éstas posean tasas de crecimiento mucho mayores, incrementos en la producción de huevos, aumentos de la masa muscular en pechuga, mayor fertilidad, calidad de la carne y menores desórdenes metabólicos (lo que se traduce en un incremento de la eficacia en aprovechamiento del pienso) y esqueléticos ¹⁶⁷. La tendencia actual es mejorar aquellos aspectos relacionados con la salud, no solo del ave, sino del hombre, ya que se intenta mejorar la inmunidad natural del ave frente a *Salmonella*, *Campylobacter*, enfermedad de Marek y gripe aviar ¹¹⁷.

La producción de broilers es en general muy intensiva e integrada, con alta densidad de aves por metro cuadrado, muy tecnificada, con un control muy alto de las condiciones ambientales (luz, temperatura, ventilación, etc...), de la alimentación y de la bioseguridad. El número de animales va aumentando de forma exponencial en cada etapa de producción, pero, por el contrario y de forma general, las condiciones de bioseguridad también disminuyen según avanzamos en la producción. Las principales medidas de bioseguridad se describen con detalle en los artículos 1, 2 y 4.

Existen unas pocas granjas en el mundo que se encargan de mantener la pureza genética de las distintas líneas comerciales de aves disponibles en el mercado. La granja origen de las aves de nuestro estudio se encuentra en EE UU. Esta granja suministra aves a diferentes zonas del mundo, entre ellas a Inglaterra, que es de donde se originan todas las aves de nuestro estudio. Es desde allí, en las granjas denominadas “*GreatGrandparent breeder broiler farms*” (GGPBF), desde donde se exportan a España pollitos de 1 día. Estas aves pasan a las granjas de abuelas (*Grandparent breeder broiler farms* –GPBF–), pero a la fase de recría, donde crecen hasta la semana 20 de vida, separadas por sexo (3 naves de hembras y una de machos).

En el caso de las granjas de nuestro estudio, a las 20 semanas de vida, las aves se trasladan a fase de producción, en alguna de las 5 granjas de abuelas, situadas todas en un área de aproximadamente 30 Km² (Figura 5). Cada una de estas granjas alberga aproximadamente 16000 pollitos, con una distribución de un 8% de machos y un 92% de hembras. Durante la vida productiva de las hembras, hasta la semana 60 de vida, cada una puede llegar a producir hasta 132 huevos embrionados. Como se puede ver en la figura 5, los lotes de aves de las granjas de abuelas abastecen a las granjas de reproductoras (*Parent breeder broiler farms* –PBFs–), repartidas por todo el país. Las granjas de reproductoras poseen características más heterogéneas en cuanto a número de aves (Tabla 14. Anexo I) y medidas de bioseguridad.

Estas granjas pueden producir ya pollos de carne, aunque por lo general abastecen de huevos embrionados a las granjas de broilers, que es el punto final de la cadena de producción de carne de pollo.

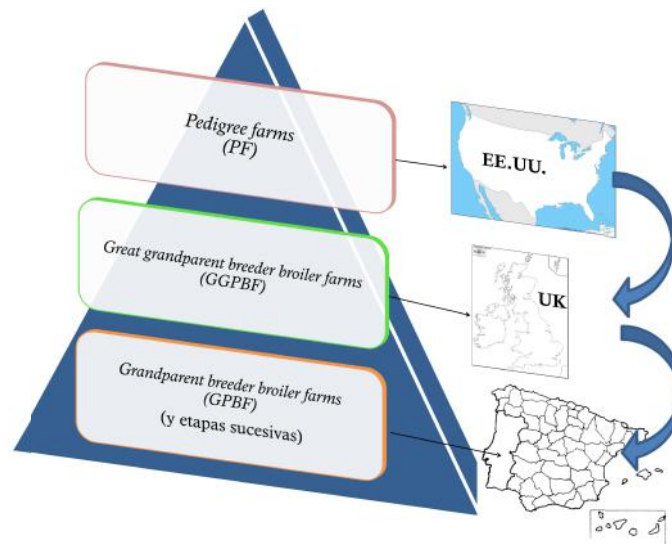


Figura 4: Esquema del sistema de producción de carne de pollo en las granjas de estudio de la Tesis. La conservación de las líneas comerciales de aves se mantiene en pocas granjas a nivel mundial (PF), que distribuyen a otras granjas repartidas por el mundo, entre ellas, las GGPBF.

Como podemos ver en la tabla 14, en algunos lotes se llevaron a cabo varios muestreos, desde la semana 20 hasta encontrar un porcentaje de aves colonizadas por *Campylobacter* adecuado para el estudio, o bien como en algunos casos (Artículo 1) para realizar un seguimiento de las poblaciones de *Campylobacter* a lo largo de la vida de las aves. Se aislaron 838 cepas a partir de hisopos cloacales (1 hisopo por ave), tipificándose 662 cepas. La tipificación consistió en los marcadores moleculares RFLP-PCR-*flaA*, *KpnI*-PFGE y *SmaI*-PFGE.

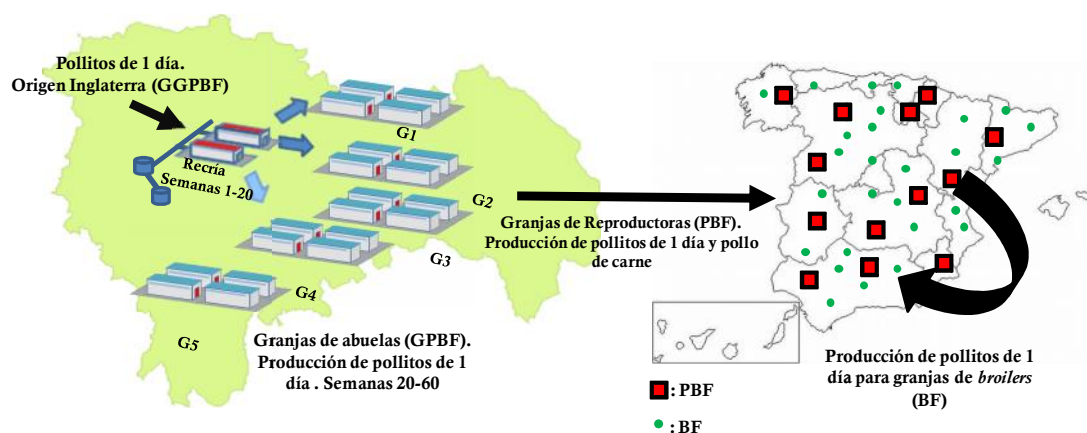


Figura 5: Esquema de la producción de pollo de engorde en España (*broiler*) desde la recepción de pollitos de 1 día procedentes de Inglaterra (GGPBFs) hasta las granjas de *broilers* (BFs).

	Granja	Lote	Años muestrs	N°aves/ granja	N° Muestrs	N° Muestrs positivos	N° Cepas aisladas*	N° Cepas Tipificadas†	<i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i> (%)
Etapas de producción	GPBF	A	2002–2003	14000	3	3	142	132	100/0
		B	2003	14000	6	2	36	18	100/0
		C	2004	14000	3	1	12	8	100/0
		D	2002	14000	1	1	65	64	100/0
		E	2002–2003	14000	6	3	46	27	100/0
		F	2003–2004	14000	10	1	16	11	100/0
		G	2002	16000	1	1	39	14	100/0
		H	2002–2003	16000	4	3	46	38	100/0
		I	2003–2004	16000	6	4	45	31	100/0
		J	2005	16000	9	2	37	21	100/0
		L	2002–2003	16000	5	3	123	73	100/0
		M	2003	16000	2	2	88	65	36.7/63.3
		N	2004	16000	4	3	33	26	100/0
		O	2002	16000	1	1	70	49	100/0
		P	2002–2003	16000	3	2	97	37	84.7/15.3
		Q	2003	16000	4	2	57	52	57/43
		R	2004	16000	1	1	29	12	100/0
	PBF	P1	2003	8300	1	1	8	8	100/0
		P2	2003	11600	1	1	20	18	100/0
		P3	2003	16500	1	1	34	34	32.4/67.6
		P4	2003	8800	1	1	6	6	100/0
		P5	2003	16000	1	1	24	17	100/0
		P6	2003	16000	3	1	35	35	22.9/77.1
		P7	2003	12000	1	1	10	10	80/20
		P8	2003	12000	1	1	25	25	0/100
		P9	2003	20000	3	1	23	23	60.9/39.1
		P10	2003	20000	1	1	20	13	100/0
		P12	2004	8000	1	1	16	16	6.3/93.7
		P13	2004	16000	1	1	15	14	100/0

Tabla 14: Tabla resumen de las granjas y lotes de aves muestreados en las dos etapas de producción seleccionadas en la Tesis: GPBF (*GrandParent Breeder Farms*) y PBF (*Parent breeder Farms*). En cada caso se tomó un hisopo cloacal por ave y del crecimiento obtenido se seleccionó una única colonia. En esta tabla resumen no se han reflejado las cepas aisladas de fuentes ambientales en las granjas. * Número total de cepas aisladas en el lote de aves, sumando el total de cepas de cada muestreo positivo. †: La tipificación en cada caso consiste en RFLP-PCR del gen *flaA*, *SmaI*-PFGE y *KpnI*-PFGE. En el caso de los lotes M, P y Q se ha reflejado la relación *C. jejuni*/*C. coli* promedio de todos los muestreos positivos.

Objetivos de la tesis

La tesis posee dos objetivos principales, que se corresponden con los capítulos I y II, así como varios objetivos secundarios derivados de estos dos principales:

Objetivo 1: Conocer la situación de las cepas de *Campylobacter* en las etapas iniciales de la producción de pollo de engorde en España y estudiar las posibles relaciones entre las poblaciones aisladas de aves con las cepas obtenidas de enfermos de campilobacteriosis.

Objetivo 1.1: Conocer la prevalencia de *Campylobacter* y las especies que colonizan las granjas del estudio.

Objetivo 1.2: Mediante el uso de técnicas de epidemiología molecular, proponer fuentes de infección/colonización en las granjas, es decir, el modo de transmisión de *Campylobacter* entre las aves y conocer el comportamiento de las poblaciones de *Campylobacter* en las granjas de estudio.

Objetivo 1.3: Relacionar las cepas aisladas en aves con cepas aisladas en humanos mediante comparación de perfiles obtenidos con marcadores moleculares.

Objetivo 2: Determinar los porcentajes de resistencia de las poblaciones de *Campylobacter* aisladas en el estudio frente a un grupo amplio de familias de antimicrobianos así como las bases moleculares de la resistencia. Estudiar la resistencia de cepas de origen clínico frente a los macrólidos.

Objetivo 2.1: Conocer la prevalencia de las resistencias a diferentes antimicrobianos en las cepas aisladas en las granjas de etapas iniciales de la producción de carne de pollo. Estudiar las posibles diferencias entre etapas de producción y entre especies aisladas. Comparación con los datos de otros países europeos.

Objetivo 2.2: Investigar los mecanismos de resistencia frente a los principales grupos de antimicrobianos de interés para el hombre.

Objetivo 2.3: Conocer la situación de resistencia, tanto en porcentajes de resistencia como en mecanismos moleculares implicados, frente a macrólidos, antibiótico de elección frente a las campilobacteriosis severas, en las cepas de origen humano recibidas en el laboratorio (prevalencia y mecanismos de resistencia).

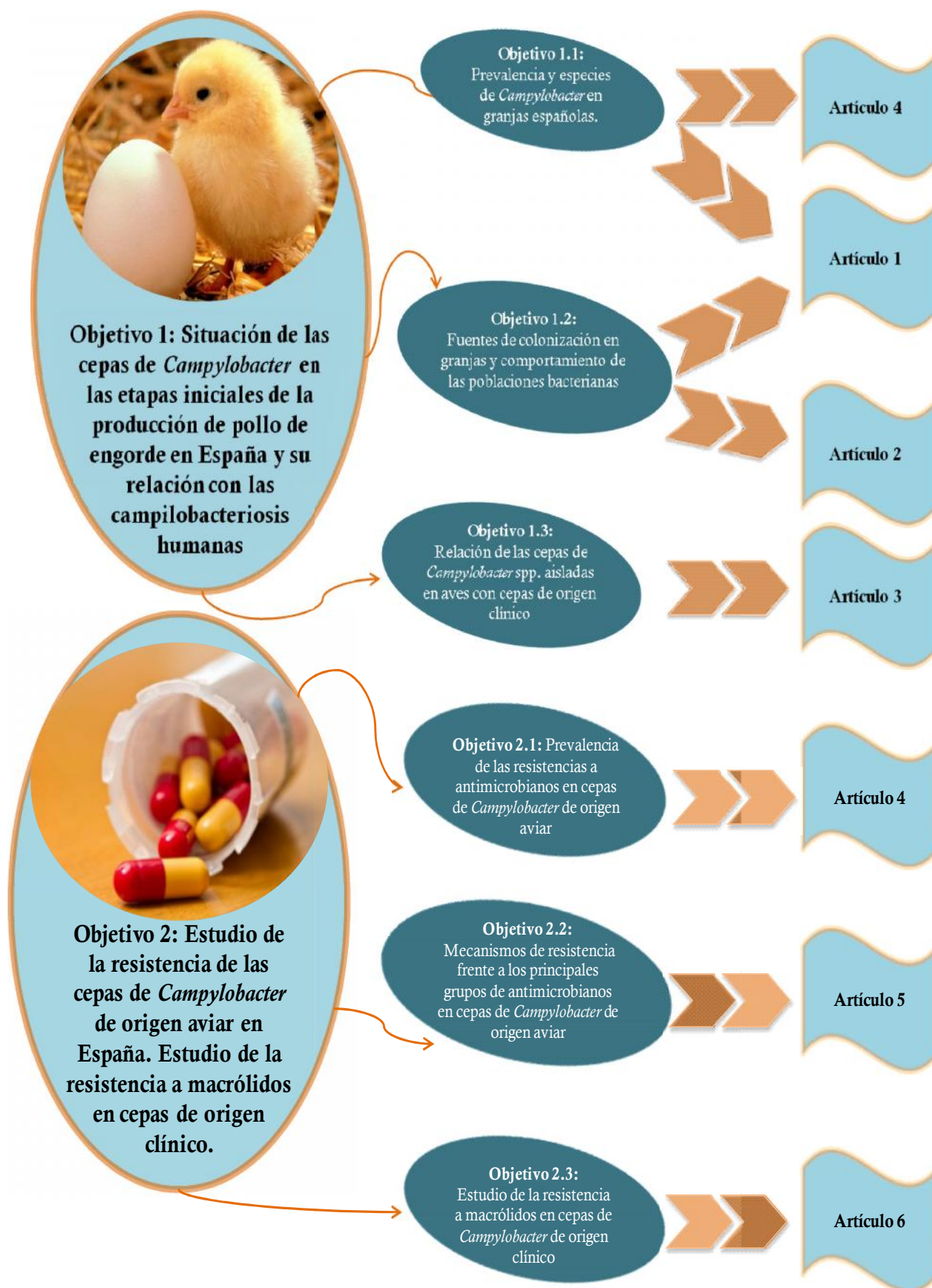


Figura 6. Esquema que relaciona los objetivos planteados en la Tesis con los artículos publicados a consecuencia del estudio.

CAPÍTULO I

Anexo II: Establecimiento de un valor “cut-off” para determinar subtipos en el análisis de los pulsotipos de *Campylobacter*

La interpretación de las semejanzas entre los pulsotipos que se generan en la técnica de PFGE, como ya hemos visto (Sección 4.1.5), es compleja en el caso de bacterias como *Campylobacter* spp., en las cuales no se deberían aplicar los criterios de Tenover³⁹⁴. *Campylobacter* posee especies (especialmente *C. jejuni*) que se suponen con una alta variabilidad en su genoma, es decir, reorganizan y modelan su genoma de tal modo que los marcadores que usamos en la técnica de PFGE (secuencias reconocidas por enzimas de restricción) pueden variar de posición y por tanto variar el tamaño y disposición de las bandas que se generan.

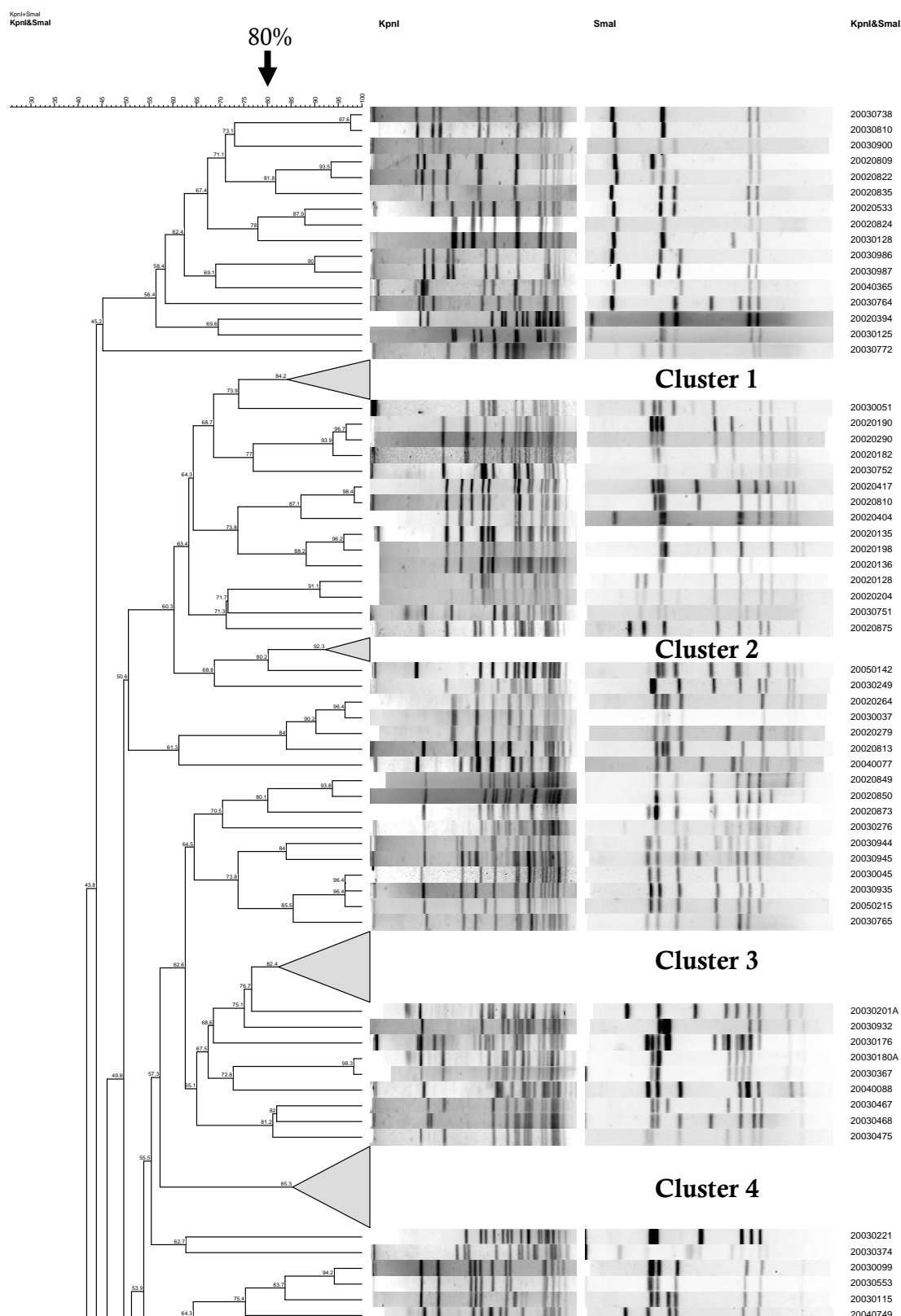
Se hace necesario, por tanto, establecer un valor de porcentaje de semejanza entre las cepas para decidir si las cepas comparadas son subtipos unas de otras, con un origen teórico común (origen clonal) o no.

Para la presente Tesis, se realizó una comparación de todos los pulsotipos diferentes obtenidos en el estudio con el análisis conjunto de los patrones de bandas (pulsotipos) obtenidos con las enzimas de restricción *Sma*I y *Kpn*I en cepas de *Campylobacter* spp. aisladas a partir de 17 lotes de abuelas y 12 lotes de reproductoras (662 cepas). Se han escogido aquellos pulsotipos combinados generados por *Kpn*I y *Sma*I, diferentes dentro de cada lote. Consideramos diferentes aquellos que varían en una sola banda. Se escogieron también pulsotipos idénticos siempre que provinieran de distintos lotes de aves.

Mediante el análisis realizado con el software Infoquest (Biorad), y con estas premisas iniciales, se seleccionaron un total de 196 pulsotipos diferentes. La comparación se realizó con unos valores de optimización y tolerancia del 1%, un análisis promedio de los experimentos (es decir, el programa concede más importancia o no al experimento que seleccionemos) y construcción del dendrograma mediante el algoritmo *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA).

Para realizar agrupamientos iniciales, el software colapsó aquellas ramas del dendrograma en las que hubiera grupos de más de cuatro miembros y entre cuyos pulsotipos hubiera una semejanza mayor del 80% (Figura 7). Descartamos aquellos *clusters* seleccionados por el software que estuvieran compuestos por aislamientos procedentes del mismo lote de aves, ya que queríamos observar semejanzas entre cepas que no fuesen subtipos unas de otras y por tanto sin un origen clonal. Para ello se escogieron aquellos *clusters* en los que los tipos analizados provinieran de cepas aisladas en distintas granjas, o de lotes de una misma granja pero con al menos un año de diferencia en el aislamiento. Con esta premisa se rechazaron los clusters 2 (formado por cepas del lote Q), y 6, del cual sabemos que está compuesto por subtipos de un clon de *C. coli* con un origen común (Artículo 2).

Los *clusters* seleccionados se investigaron mediante otro marcador de tipo global (analiza diferentes zonas del genoma) como es el *MultiLocus Sequence Typing* (MLST). Observaremos a partir de qué porcentaje de semejanza en PFGE se obtienen siete alelos idénticos para la técnica de MLST (Figuras 8 y 9).



(Continúa en la siguiente página)

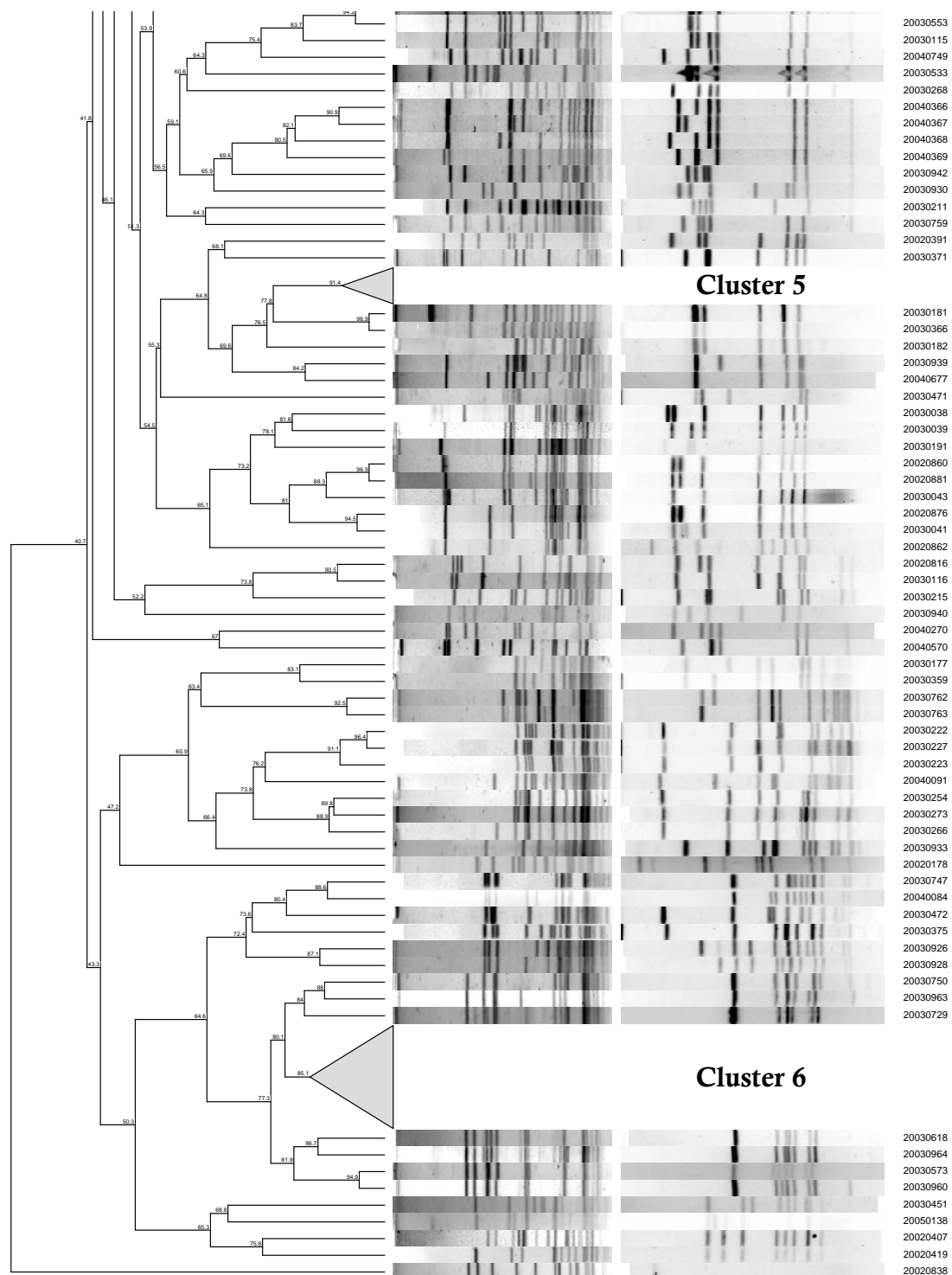
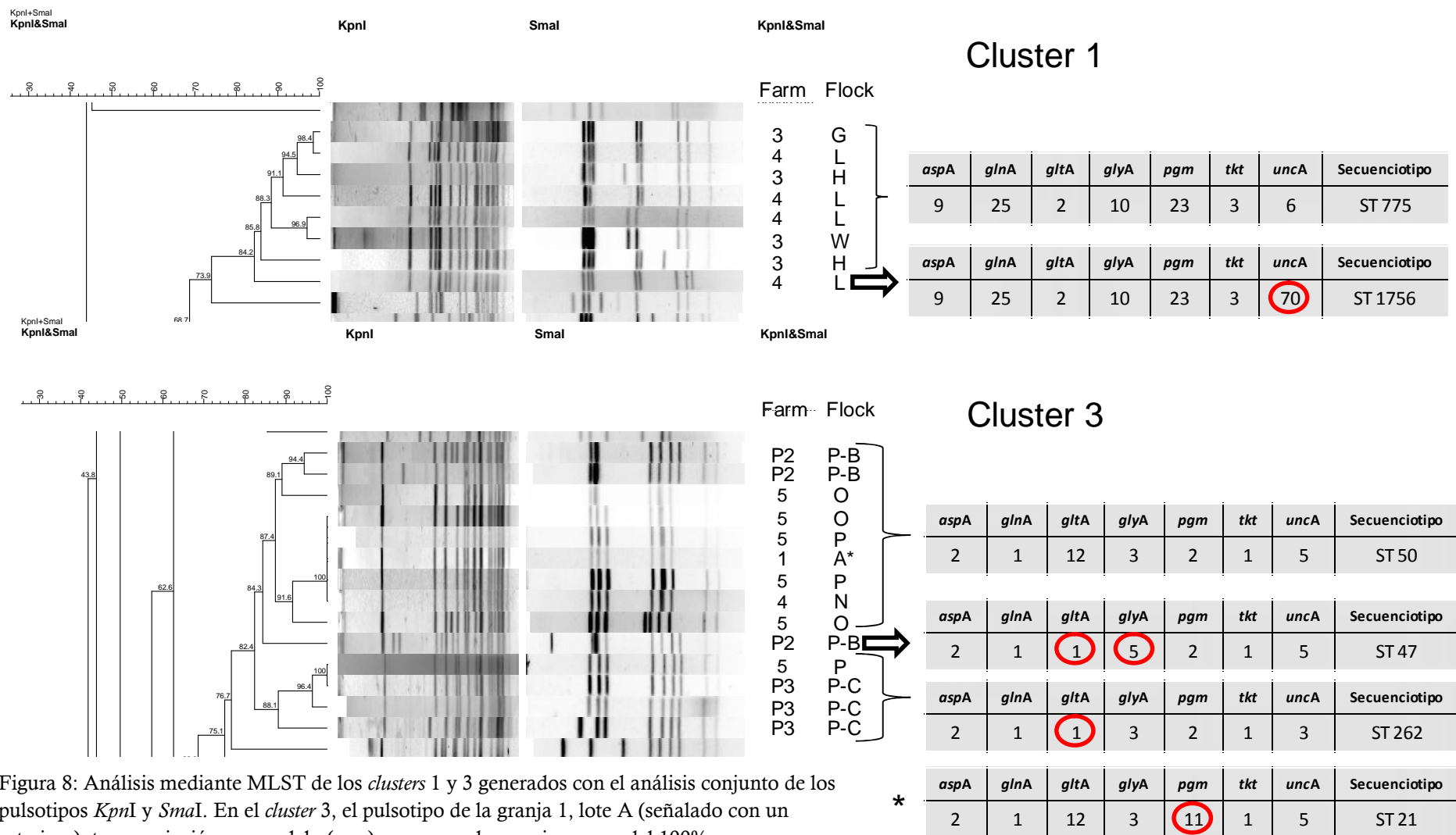


Figura 7: Dendrograma generado a partir de los 196 pulsotipos diferentes (pulsotipo combinación de *KpnI* y *SmaI*) encontrados en las 662 cepas de *C. jejuni* y *C. coli* tipificadas a partir de 17 lotes en 5 granjas de abuelas y de 12 lotes en 12 granjas de reproductoras. Se muestran de forma colapsada aquellos *clusters* formados por más de 4 cepas que posean una semejanza mayor del 80% entre ellas.



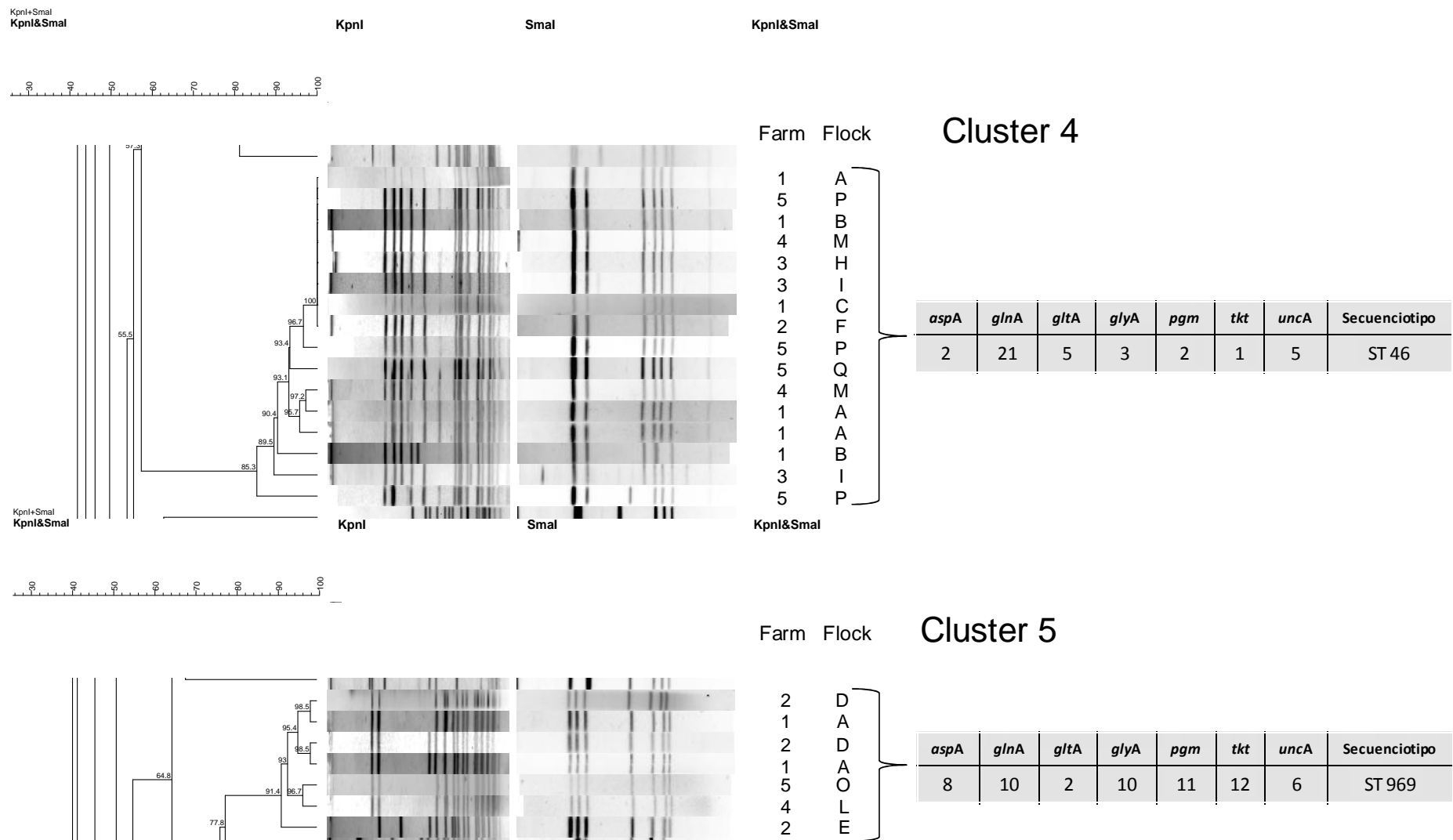


Figura 9: Análisis mediante MLST de los *clusters* 4 y 5 generados con el análisis conjunto de los pulsotipos *KpnI* y *SmaI*. En ambos casos, los *clusters* 4 y 5 se agrupan con un valor superior al 85% (85,3% y 91,4%, respectivamente) y los alelos son coincidentes para todos los pulsotipos.

Como podemos observar en la figura 8, con valores inferiores de semejanza a 85% (84.2% Cluster 1 y 84.3% Cluster 3) hay variación en algún alelo. Hubo una excepción, en un pulsotipo del Cluster 3 (Farm 1-Flock A) en el que variaba el alelo *pgm* (Alelos 2 y 11), pero la variación entre ambos es en un solo nucleótido (posición 165 T→C). Para los clusters 4 y 5, en ambos casos los porcentajes superaban el 85% encontrándose una total homología en cuanto a los alelos de MLST.

Por tanto, en los trabajos que componen esta tesis, cuando comparemos pulsotipos generados por dos enzimas de restricción (*KpnI* y *SmaI* o *BamHI* y *SmaI*), tomaremos el valor de porcentaje de semejanza \geq de 85% como de referencia para considerar los pulsotipos como subtipos unos de otros y las cepas como pertenecientes a la misma línea clonal.

Capítulo I

Artículo 1

“Dynamics of populations of *Campylobacter jejuni* in two grandparent broiler breeder farms: persistent vs. transient strains”

“Dinámica de poblaciones de *Campylobacter jejuni* en dos granjas de abuelas reproductoras: cepas persistentes vs. transitorias”

Resumen del artículo:

Objetivos: Caracterizar e investigar las poblaciones de *Campylobacter jejuni* que colonizaban las aves y el ambiente de dos granjas de abuelas reproductoras de broilers a lo largo de cuatro años mediante el uso de marcadores moleculares y el perfil de resistencias a antimicrobianos. Nos centramos principalmente en dos aspectos: i) Estabilidad de las cepas: Nos referimos a si el perfil de bandas generado con las técnicas de tipificación usadas es único o si por el contrario existen ligeras variaciones dando lugar a subtipos del mismo. ii) Persistencia de las cepas: Las cepas encontradas se pueden aislar a lo largo de diferentes muestreos y lotes o, por el contrario, solamente se detectan en una ocasión, siendo sustituidas por otras.

Métodos: A lo largo de cuatro años se llevaron a cabo muestreos de dos granjas de abuelas reproductoras, tanto de hisopos cloacales (1 hisopo por ave, una colonia por hisopo cloacal) como de diferentes muestras ambientales durante el periodo de vaciado sanitario de las granjas. Las cepas aisladas fueron caracterizadas mediante su perfil de macrorestricción (PFGE-*Sma*I y PFGE-*Kpn*I) y mediante PCR-RFLP del gen *flaA* (la combinación de los tres marcadores define cada genotipo), así como tests de susceptibilidad frente a siete antimicrobianos por técnica de difusión en disco.

Resultados: Todos los muestreos en aves fueron negativos para *Campylobacter* al inicio del estudio (20 semanas de edad) y la mayoría de lotes de aves permanecieron sin colonizar hasta las 23 semanas de edad. En el estudio se describieron 18 genotipos diferentes, en los que se podían encontrar genotipos persistentes. Uno de ellos (Genotipo 2) fue detectado en las aves de las dos granjas a lo largo de todo el experimento. Por contra, la mayoría de genotipos fueron transitorios, detectándose solamente en un muestreo, sin aparecer en los

siguientes. Respecto a la estabilidad de los genotipos, encontramos algunos sin variación en el perfil de bandas de los marcadores moleculares, mientras que en otros casos sí se observan distintas variaciones (distintos subtipos). En cuanto a los muestreos ambientales, solo uno fue positivo (en la granja 2), detectándose dos genotipos, uno de los cuales había sido previamente descrito en las aves de esa granja dos años antes. Los datos de susceptibilidad a antimicrobianos apuntan a que el ambiente exterior de la granja constituye un reservorio para ese genotipo. Por otra parte, la resistencia a quinolonas (sola o combinada con otras resistencias) fue la más frecuente en todo el estudio: 68.5%.

Conclusiones: Este trabajo muestra la complejidad en el estudio de la dinámica de las poblaciones bacterianas de *Campylobacter* en las aves de una granja, pese a ser un ambiente teóricamente controlado. Existe una influencia de la edad de las aves en la colonización por *Campylobacter*, ya que hasta una determinada edad no se detecta la bacteria en el intestino de las aves. Posteriormente, debido a las características de producción en las granjas: N° de animales por nave, hábitos de comportamiento y alimentación, etc., la propagación es muy rápida, existiendo prevalencias (numero de aves colonizadas por *Campylobacter* dentro de un lote) muy altas. En general, las cepas exhibieron una alta estabilidad genética, sin que aparezcan diferentes subtipos dentro de cada genotipo. La mayoría de las poblaciones descritas eran transitorias en las granjas, detectándose en un solo muestreo. Los muestreos ambientales se mostraron poco eficaces, aunque en un caso se detectó un genotipo previamente aislado en las aves de la granja donde se obtuvo la muestra ambiental. Gracias a los datos de resistencia pudimos teorizar sobre la dirección de la colonización de dicha cepa. En cuanto a los datos de resistencia a antimicrobianos hay que destacar los porcentajes de cepas de *Campylobacter* resistentes a quinolonas y multiresistentes, lo que es un asunto preocupante para la Salud Pública.

Claves del artículo y relación con los objetivos planteados

1. Las aves en recría fueron negativas para *Campylobacter*: La colonización por *Campylobacter* no fue detectable hasta varias semanas después de su traslado a las granjas de abuelas. Se observa, por tanto, una relación entre la edad de las aves y la colonización de *Campylobacter*. Relacionado con el objetivo 1.1, la prevalencia es dependiente de la edad de las aves.
2. *Campylobacter jejuni* como única especie aislada en el estudio que da origen a este artículo: En las dos granjas de estudio, tras exhaustivos muestreos, solo fue identificada una especie: *Campylobacter jejuni*. Relacionado con el Objetivo 1.1, determinando que *C. jejuni* es la principal especie aislada en la tesis.
3. Comportamiento de las poblaciones de *Campylobacter*: Se observan poblaciones de *Campylobacter* que persisten entre lotes sucesivos de aves, pese a las medidas de limpieza y desinfección llevadas a cabo (Vaciado sanitario). Por el contrario, otras son transitorias, siendo detectadas solo en un muestreo. Existen poblaciones de *Campylobacter* con variación en los pulsotipos analizados (subtipos) mientras que por el contrario, otros parecen muy estables. Relacionado con el objetivo 1.2, se observa variedad de comportamientos de las poblaciones de *Campylobacter* en el mismo ambiente.
4. Aislamiento en el ambiente exterior de la granja: Se hace evidente la dificultad en el aislamiento de *Campylobacter* en las muestras ambientales. Se aislaron dos genotipos en el exterior de la granja, en ambiente acuático, ambos en el foso de paso de los vehículos que entran o salen de las granjas, donde se desinfectan las ruedas. Uno de ellos idéntico a un genotipo encontrado en las aves dos años antes (genotipo 15). Con la ayuda del fenotipo de resistencia pudimos teorizar con que el exterior de la granja constituye un reservorio de la cepa aislada. Relacionado con el objetivo 1.2, encontramos una posible fuente externa en una de las granjas de estudio.



Dynamics of populations of *Campylobacter jejuni* in two grandparent broiler breeder farms: Persistent vs. transient strains

D. Perez-Boto^{a,*}, F.J. Garcia-Peña^b, J.C. Abad-Moreno^c, M.A. Echeita^a

^a Laboratorio de *Campylobacter*, *Yersinia* y *Vibrio*, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain

^b Laboratorio Central de Veterinaria, Dpto. Bacteriología, Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino, Algete, Madrid, Spain

^c COBB España, Alcalá de Henares, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 July 2011

Received in revised form 23 March 2012

Accepted 24 March 2012

Keywords:

Campylobacter jejuni

Genotypes

Bacterial populations

Broiler breeder farms

Sources of infection

ABSTRACT

The objectives of the study were to characterize and investigate the populations of *Campylobacter jejuni* in two grandparent broiler breeder farms over four years. Caecal as well as farm environmental samples were obtained. *Campylobacter* isolates were characterized by macrorestriction profile (*Sma*I and *Kpn*I-PFGE) and PCR-RFLP of the *flaA* gene. Susceptibility tests against seven antimicrobials were also performed. Birds were negative for *Campylobacter* spp. when they came to these two production farms (20 weeks), and most of the flocks remained uncolonized until they were 23 weeks old. Eighteen genotypes were characterized, with one of them (genotype 2) appearing and persisting over the study period in the two farms. In general, the strains exhibited high genetic stability, and most of them could be seen as transient in the farms, being substituted by other strains when their flock was substituted. Only one environmental sampling was positive for *C. jejuni*. Two different genotypes were characterized; one of them was isolated from the birds of that farm two years before. The susceptibility data point to the idea of an environmental source or reservoir of this genotype. Regarding the susceptibility of the populations, as other studies have shown, quinolone resistance (alone or combined with other resistances) was the most frequent: 68.5%. Quinolone- and multidrug-resistant strains are a matter of concern in public health. In conclusion, this survey shows the complexity of the study of the colonization of farms by *C. jejuni*.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Campylobacter jejuni is considered the most frequent cause of bacterial gastroenteritis in developed countries (Friedman et al., 2004). Most of the cases are sporadic and linked with the handling or consumption of poultry meat (Peyrat et al., 2008). Poultry farms free of *Campylobacter* spp. should be a public health aim to reduce the high number of cases of human campylobacteriosis.

In order to control *Campylobacter* spp. prevalence among broiler farms, it is necessary to determine the sources of this bacterium in these installations. There are multiple potential sources of *Campylobacter* spp. in broiler houses, pointing to the following as main sources: insects (Hald et al., 2008), rodents (Hiatt et al., 2002), drinking water (Ogden et al., 2007), and the surrounding environment (Newell and Fearnley, 2003). Vertical transmission does not seem to be a main cause of infection (Callicott et al., 2006).

Molecular genotyping is the best tool to investigate and establish epidemiological relationship between bacteria. The reported genetic instability in *Campylobacter* spp. hinders the interpretation of their molecular epidemiology (Dingle et al., 2008). Therefore, it is generally recommended to use more than one genotyping method. For *Campylobacter*

* Corresponding author at: Laboratorio de *Campylobacter*, *Yersinia* y *Vibrio*, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III Ctra. Majadahonda-Pozuelo, km. 2, Majadahonda, Madrid 28220, Spain.
Tel.: +34 918223642; fax: +34 915097966.

E-mail address: dpboto@isciii.es (D. Perez-Boto).

spp. the most successful genotyping methods are PCR-RFLP-*flaA*; PFGE using *SmaI* or *KpnI* and MLST (multilocus sequence typing). PCR-RFLP of the *flaA* gene is a simple and reliable method to use for *Campylobacter* spp., with a good discrimination level (Petersen and Newell, 2001). PFGE is considered the gold standard in epidemiological studies and outbreak investigations (Fitzgerald et al., 2001). Finally, MLST has been proven to give valuable information about population dynamics for *Campylobacter* spp. (Kwan et al., 2008). Susceptibility data from the bacteria might be useful not only for clinical considerations, but also (the antimicrobial resistance profile) in the survey of populations of *Campylobacter* spp. within broiler farms (Messens et al., 2009).

The aim of this survey was to typify and study the populations of *Campylobacter* spp. isolated in two grandparent broiler breeder farms with high biosecurity measures during four years (2002–2005), describing the population dynamics of these bacteria between sequential flocks despite biosecurity, cleaning, and disinfection measures.

2. Materials and methods

2.1. Farm description

Two grandparent broiler breeder farms belonging to the same broiler production company have been studied. In these production farms, the grandparents of commercial broilers arrive at 20 weeks of age from previous rearing farms until 60 weeks, when they are slaughtered.

At this stage of broiler production, biosecurity measures are very tight; this is demonstrated by the fact that the farms are *Salmonella* and PPLO (pleuropneumonia-like organism) free.

Farms 1 and 2 are located very near to each other, within a five-square-kilometre radius. The farms comprise four sheds each, with 3500 and 4000 animals in each shed, respectively. Therefore, there is a population of 14,000 and 16,000 birds, respectively, in these production farms.

Both farms have the same technical characteristics. Their entire floors are made of concrete, they are surrounded by fences, and vegetation around the fences is removed to avoid the presence of rodents near the farm. Furthermore, all farms have implemented a program for pest and rodent control. The windows and ventilation systems of the sheds are covered by mesh to prevent insects from entering.

Water comes from a general distribution line and is sanitized through a chlorination system by pulse pumps. Vehicles entering the farm are thoroughly cleaned and must pass through a wheel wash bath filled with water and phenolic compounds in a solution.

All the workers who enter the sheds must pass through a shower and wear specific clothes and boots. These clothes are exclusive to each shed to avoid cross-contamination between sheds.

In addition, to avoid cross-contaminations between the two farms, they do not share workers, materials, or supplies.

All farms have an all-in/all-out management system and the time between two successive flocks is about 10–12 weeks. During the empty period, the drinkers, feeders and

slats are cleaned and disinfected. Also, the litter is removed and the houses are cleaned with pressure water to remove debris, and subsequently treated with pressure water plus alkaline surfactant detergent. Finally, the houses are disinfected with Virkon® and fumigated with formaldehyde vapours (Formaster®). When the surfaces are dry, a litter of wood shavings is spread and the disinfected drinkers, feeders and slats are assembled two or three days before the birds arrive.

2.2. Poultry sampling

The tight biosecurity measures restrict the full access of visiting researchers to the farms. Prevalence data of the selected farms were initially unknown. For that reason two samplings were carried out without taking in account the age of the birds: 28 weeks-old at flock A and 57 weeks-old at flock D. Later, in an attempt to establish the onset of infection in the farms, or at least the beginning of *Campylobacter* spp. detection, most of the samplings were performed in the first weeks after the birds were placed in the farms (between 20 and 30 weeks); finally, to establish the final prevalence, in flocks A and E sampling were performed at the end of their productive lives (59–60 weeks). In order to clarify the sampling plan and data, we show in Table 1 the number of samplings performed in each flock, the number of samples taken in each sampling, the age of the birds, the month of sampling, and the prevalence of *Campylobacter* spp.

Cloacal samples were taken individually using sterile swabs and Cary-Blair medium without charcoal (Pronadisa, Madrid, Spain) as transport medium. All swabs were cultured within 3 h from the time of collection. Each swab was streaked onto Karmali agar (CM0935 plus Supplement SR0167; Oxoid, Basingstoke, UK) and Abeyta–Hunt–Bark (AHB) agar plates (AHB medium prepared following FDA recommendations: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM061209>, last accession 23.01.12). The plates were incubated for 48 h at 42 °C in a microaerobic atmosphere (CampyGen 2.5 L; Oxoid, Basingstoke, UK). Presumptive colonies of *Campylobacter* were re-streaked and propagated on Columbia agar with 5% sheep blood medium (Becton Dickinson, Madrid, Spain).

2.3. Environmental sampling

Exhaustive environmental samplings were performed in the two farms (Farm 1: February 2002, March 2003, April 2004; Farm 2: October 2002, October 2003 and January 2005). These samplings were conducted in the depopulation periods between flocks. In all cases, five samples of each type were taken. Dust samples from the ventilation system and over different surfaces inside the poultry houses were taken. Water samples were taken at different points along the drinking system: the distribution pipes, bell drinkers, and drainpipes in the four sheds. In addition, water samples were taken from the dip where trucks are disinfected upon entry into and exit from the farm. Nests, pan feeders, and workers' boots were also sampled. Finally, *Alphitobius diaperinus* (darkling beetles)

Table 1

Summary of poultry samplings performed in the farms over four years of study.

Farm	Flock	Year	Sampling number	Age of birds (weeks)	Month and year of sampling	Positive samples/total of samples
1	A	2002–2003	1	28	May 2002	80/80
			2	48	October 2002	39/40
			3	60	February 2003	19/20
	B	2003	1	20	May 2003	0/120
			2	21	June 2003	0/80
			3	23	June 2003	40/90
	C	2004	1	23	May 2004	0/40
			2	26	June 2004	40/40
			3	27	July 2004	38/40
	D	2002	1	57	July 2002	38/40
2	E	2002–2003	1	21	November 2002	15/60
			2	22	November 2002	16/40
			3	23	December 2002	13/15
	F	2003–2004	4	60	August 2003	6/10
			1	20	November 2003	2/80
			2	21	November 2003	16/60
			3	24	December 2003	13/50
			4	27	January 2004	15/20
	G	2005	1	21	February 2005	0/80
			2	26	March 2005	0/80
			3	27	March 2005	0/75
			4	29	March 2005	0/80
			5	30	April 2005	68/109

were collected and processed as samples from the sheds. These insects were collected during the depopulation period, and all of them were dead at the moment of collection.

Environmental samples were taken using different strategies. Dust samples from surfaces were taken with sterile sponges and processed in Bolton broth (Oxoid CM0983). In all samples, 25 ml of broth was added to each sponge in a sterile bag immediately after the sampling.

Samples from nests, pan feeders, and workers' boots were taken with sterile swabs and transported within the next 3 h in Cary-Blair medium without charcoal. They were cultured following the same procedure used for cloacal swabs.

From each water sample, 25 ml were taken, placed in a sterile plastic container, and transported at 4 °C to the laboratory. These were processed following the protocols of the FDA <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManual-BAM/UCM072616>, last accession 13.02.11).

Darkling beetles were collected in sterile bags, to which 25 ml of Bolton broth was added. These were then processed using a stomacher. The resultant broth was incubated at 37 °C for 48 h in a microaerobic atmosphere.

One-hundred microliters of incubated Bolton broth (from darkling beetles or sterile sponges) was streaked onto mCCDA (modified charcoal cefoperazone deoxicolate agar) (Oxoid CM0739) and Abeyta–Hunt–Bark agar media, respectively. These media were cultured at 42 °C for 48 h in a microaerobic atmosphere.

2.4. Species identification

The identification of *Campylobacter* spp. strains was based on typical morphology (seagull-shaped Gram negative bacilli) and by typical darting motility or corkscrew motion under dark-field microscopy, besides biochemical tests for oxidase and catalase.

A hippurate test was carried out for all the isolates as previously described (Wittwer et al., 2005) in order to identify *C. jejuni* isolates. For those isolates with doubtful results, multiplex PCR was carried out as previously described (Persson and Olsen, 2005). DNA templates were obtained using a previously described DNA extraction procedure (Yates et al., 2002).

All the PCRs in the study were performed using a Ready-To-Go system (GE Healthcare Life Sciences, UK) according to the manufacturer's recommendations.

2.5. *flaA* gene PCR-RFLP genotyping

Restriction fragment length polymorphism of the *flaA* gene (PCR-RFLP *flaA*) was performed as previously described (Nachamkin et al., 1993). Five microliters of PCR product was digested with 6 units of *DdeI* enzyme (FastDigest[®], Fermentas GmbH, Madrid, Spain) according to the manufacturer's instructions. The fragments produced by digestion were separated by electrophoresis in a 2.5% (wt/vol) MS-8 agarose gel (Pronadisa, Spain) in Tris–acetate–EDTA (TAE) 1× buffer.

2.6. PFGE-*SmaI* and PFGE-*KpnI*

Genomic DNA was prepared in accordance with the protocols of PulseNet (Ribot et al., 2001). DNA macrorestriction and PFGE were also performed according to the PulseNet protocol for the restriction enzyme *SmaI* (Roche, Spain) and the protocol from On and collaborators (On et al., 1998) for the restriction enzyme *KpnI* (Takara, Conda, Spain).

2.7. Computer-assisted analysis of fingerprinting experiments

All the fingerprinting experiments in this study were analyzed with a global comparison using an average

estimation from experiments using the InfoQuest FP software (Bio-Rad, Spain). A dendrogram was constructed using the Unweighted Pair Group Method with Averages (UPGMA).

2.8. Multilocus sequence typing

Multilocus sequence typing (MLST) was carried out as previously described (Dingle et al., 2008). MLST alleles and sequence types (STs) were assigned by querying the sequences in the public MLST database: <http://pub-mlst.org/campylobacter/>.

2.9. Susceptibility tests (Kirby–Bauer method)

It is commonly accepted that the disk diffusion method is comparable to the agar dilution or the E-test method (Gaudreau et al., 2008). Due to the high number of isolates to be tested, we chose the disk diffusion method for testing the isolates in the survey. Susceptibility tests against quinolones (nalidixic acid 30 µg and ciprofloxacin 5 µg), macrolides (erythromycin 15 µg), aminoglycosides (gentamicin 10 µg), β-lactams (amoxicillin 10 µg and amoxycillin plus clavulanic acid 30 µg), tetracycline (30 µg), and chloramphenicol (30 µg) (Oxoid, Madrid, Spain) were performed using the disk diffusion method as previously described (Wittwer et al., 2005). Mueller–Hinton agar supplemented with 5% defibrinated sheep blood was used as culture medium in the test (Becton Dickinson, Madrid, Spain).

The antimicrobial cut-off values for the inhibition zones were selected from the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) for erythromycin and ciprofloxacin (CLSI, 2010), and from the “Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie” for the rest of the antimicrobials (cut-off values available at http://sfm-microbiologie.org/UserFiles/file/CASFM/casfm_2010.pdf, last accession 01.19.12).

We codified each group of antimicrobials with a single letter: quinolones, Q; macrolides, E; aminoglycosides, G; β-lactams, A; tetracycline, T; and chloramphenicol, C. For typification purposes, we indicated only the resistances; thus, a $Q_R-A_R-T_R$ strain means that it is resistant to quinolones, β-lactams, and tetracycline. The *C. jejuni* type strain ATCC 33560T was used as quality control for inhibition zone determination as recommended by the CLSI (CLSI, 2010).

3. Results

3.1. Prevalence of *Campylobacter*

The numbers of positive samples from the total are presented in Table 1. During the four years that the study lasted, 218 samples out of 510 were positive for *Campylobacter* in farm 1. Two-hundred and two samples out of 799 were positive for *Campylobacter* in farm 2. In most of the cases, the isolates were clearly hippurate positive and, consequently, identified as *C. jejuni*. Several doubtful hippurate results were confirmed as *C. jejuni* by the selected multiplex PCR.

The prevalence data differed depending on the week of the productive life of the poultry; thus, at the end of their productive life (48–60 weeks), the prevalence in cloacal swabs was much higher (92.7% in samplings at 48, 57, and 60 weeks in flocks A, D, and E) than at the first weeks (20–30 weeks) of productive life (26.5%).

Knowing the month when positive samples were obtained, the possibility of seasonality could be investigated. Table 1 shows the month of isolation of *C. jejuni* by flock and farm.

3.2. Environmental samples

Three environmental samplings were conducted in the farms 1 and 2, all of them at the time of depopulation. No *Campylobacter* spp. was isolated in any of the environmental samples from farm 1. A positive sample was obtained (January 2005) from farm 2. This came from water inside the dip where trucks are disinfected. From this positive sample 10 different colonies were selected and characterized.

3.3. Genotypes and resistotypes of *Campylobacter*

We characterized the isolates obtained from the two farms during the four years of study. When the profile of a fingerprint experiment (*KpnI*-PFGE, *SmaI*-PFGE, or PCR-RFLP-*flaA*) varied in a single band from another, we considered this profile as a new one. We defined the combination of the three profiles (*KpnI*-PFGE, *SmaI*-PFGE, and PCR-RFLP-*flaA*) as a genotype.

When the similarity of two genotypes exceeds 80% we consider that they are subtypes of the same genotype. All genotypes and the similarities among them are shown in Figs. 1 and 2.

During the four years of survey, 14 different genotypes were described in farm 1 and five in farm 2. The two farms shared a common genotype (genotype 2). This common genotype was further characterized by MLST, giving the sequence type: ST-50.

The scheme of the evolution (flowchart) of the populations of *Campylobacter* in farm 1 and farm 2 is shown in Fig. 3. In the first sampling period in flock A, five genotypes were isolated and characterized (genotypes 1, 2, 9, 10, and 13). In the next sampling period (48 weeks), eight different genotypes were isolated and characterized: genotypes 1, 2, 10, 13, 3, 5, 8, and 14 (the last four were characterized for the first time). In the last sampling period in that flock (60 weeks), 10 different genotypes were isolated and characterized: genotypes 1, 2, 10, 13, 8, 14, 4, 6, 7, and 11 (The last four were characterized for the first time). In the next flock (flock B) only one genotype was characterized (genotype 2), and in flock C two different genotypes were isolated and characterized: genotypes 2 and 12.

With regard to farm 2 (Fig. 3), in the only sampling done in flock D, only one genotype was isolated and characterized: genotype 15. In the next flock that inhabited the farm (flock E), the same genotype was isolated in the first three sampling periods (weeks 21, 22, and 23). In the fourth sampling period (60 weeks), genotype 15 did not appear,

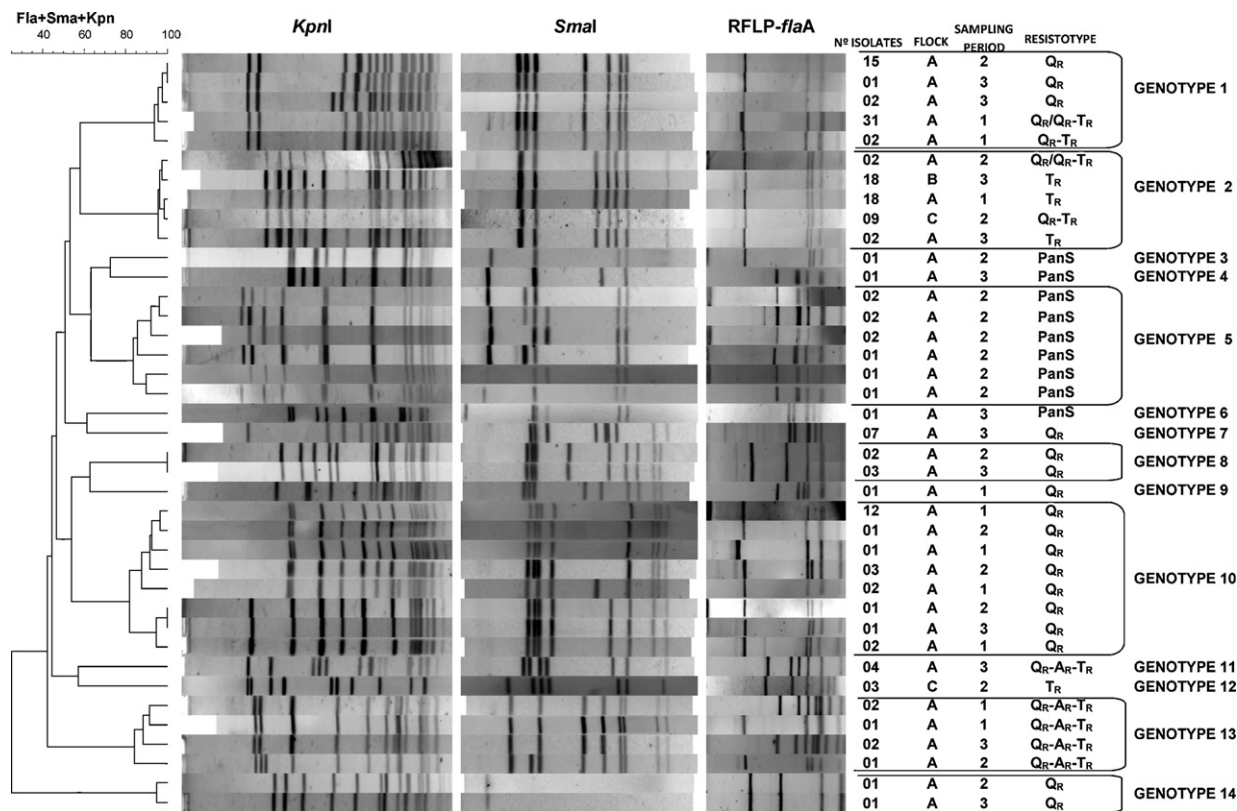


Fig. 1. UPGMA dendrograms from farm 1 obtained using the different molecular profiles of the isolates. Each different profile is presented by flock and sampling period (W: environmental isolates). The resistotype of each molecular profile is also shown (the nomenclature of the resistotypes is explained in the text).

being substituted by two new genotypes: 2 and 18. Over the four samplings carried out in the next flock (flock F), only genotype 2 was detected. Finally, in flock G only one genotype was characterized: genotype 16, which was a new one and not related to the former genotypes found in that farm.

Regarding the environmental isolates, eight out of 10 colonies were characterized as genotype 17, while 2 out of 10 were typified as genotype 15.

With regard to the susceptibilities of the isolates to antimicrobials, considering all susceptibility data, we found that 68.5% of the isolates were resistant to quinolone, 46.4% to tetracycline, and 9.6% to amoxicillin. Pansusceptible (PanS) isolates accounted for 3.7%. The most frequent resistotype in farm 1 was Q_R at 53.4%, followed by T_R at 25.1%, Q_RT_R at 8%, PanS at 7.4%, and Q_RT_RA_R at 6.1%. The most prevalent resistotype among the isolates in farm 2 was Q_R with a rate of 32.9%, followed by T_R with 30.4%. The other resistotypes were Q_RT_R (23.4%) and Q_RA_R (13.3%).

Following the criteria used by other authors (Lehto-polku et al., 2010), we defined strains as multidrug-resistant (MDR) if they exhibited resistance to three or more antimicrobial groups. Only isolates from genotype 13 could be considered MDR. On the other hand, all the isolates of genotypes 3, 4, 5, and 6, and the environmental isolates from genotypes 15 and 17 could be considered pansusceptible. A detailed distribution of the resistotypes

within the two farms and their relationship with the different genotypes are shown in Figs. 1 and 2.

4. Discussion

Grandparent Breeder Broiler farms are facilities with high biosecurity measures. This theoretically limits the potential sources of new strains of *Campylobacter* spp. Thus, during our study, it might be easier to monitor the dynamics of the populations of the bacteria, flock after flock than with continuous entry of new strains from outside the farms.

As shown in Table 1, *C. jejuni* was isolated along the study without influence of season or climatic conditions, therefore no evidences of seasonality were found in our study. This fact supports other studies which limit the influence of seasonality in the prevalence of *Campylobacter* spp. in poultry farms (Colles et al., 2011).

Knowing that the birds came from rearing farms negative for *Campylobacter* spp., we may detect the onset of colonization in farm 1 from one to five weeks after they were moved to the production farm. In both farms *C. jejuni* was detected relatively early, despite the biosecurity measures. There were differences in prevalence between the two farms at different weeks of the production life, from an average 26.5% (20–30 weeks) to 92.7%. (48–60 weeks). Clearly, when *Campylobacter* began to colonize a flock, the bacteria quickly spread until almost all the birds

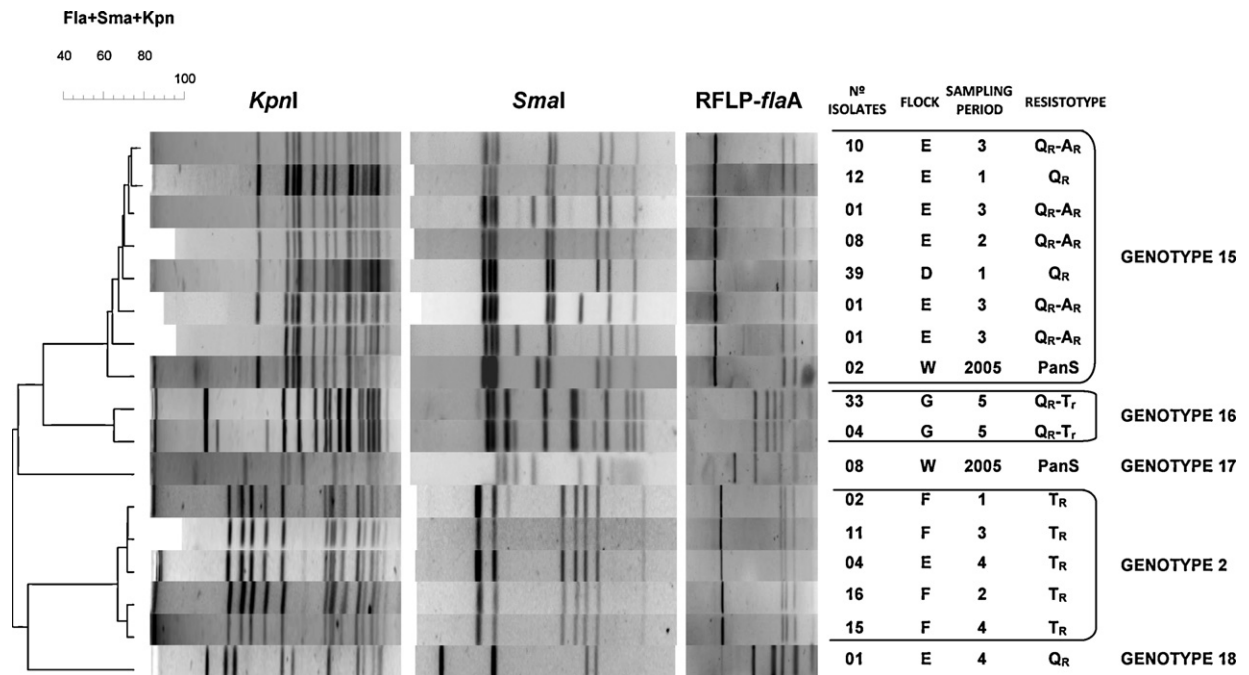


Fig. 2. UPGMA dendrograms from farm 2 obtained using the different molecular profiles of the isolates. Each different profile is presented by flock and sampling period (W: environmental isolates). The resistotype of each molecular profile is also shown (the nomenclature of the resistotypes is explained in the text).

were colonized. Our survey indicates that the age of the flock is a main factor in the prevalence of *Campylobacter*. This finding supports previous observations (Colles et al., 2011).

The similarities among the characterized genotypes are shown in dendrograms in Figs. 1 and 2. From these dendrograms we can infer that different populations of *C. jejuni* inhabiting the two farms. Knowing the different genotypes, and when and where they appeared, a possible scheme of the dynamics of the populations of *C. jejuni* could be constructed, as shown in the flowchart in Fig. 3. Flocks may become colonized by only one *Campylobacter* genotype (Ring et al., 2005), or by different coexisting clones, reflecting different environmental sources of infection (Alter et al., 2011). Both situations were possible in our study (Fig. 3). Nevertheless, the predominant situation in our study was that of flocks in which only one or two different genotypes were isolated and characterized. That may indicate that there would be only one source of infection. In our study there were both persistent and transient genotypes which supports previous observations (Kudirkiene et al., 2010; Ridley et al., 2011). As shown in Fig. 3, most genotypes could be associated with a particular farm and flock, and only genotypes 2 and 15 persisted among flocks. It is plausible that sporadic genotypes were not able to survive or persist in the house environment after the depopulation and cleaning period. Strikingly, genotype 2 appeared in the two farms along the study (Fig. 3). This genotype was further investigated by MLST, which showed it to be ST-50. This sequence type is common in the MLST database and frequently found in chicken (Habib et al., 2009). However,

the origin of this genotype is difficult to ascertain. The presence of this genotype simultaneously in different flocks/farms points to a common source for the farms: environmental, farm staff, or the transport of birds/foods. However, genotype 2 was not recovered in any of the environmental samplings. In fact, we obtained only positive environmental samples (from the wheel wash bath) in a single sampling conducted in farm 2. This difficulty in obtaining and maintaining environmental isolates of *Campylobacter* is a well-known fact (Ridley et al., 2011). Two different genotypes were detected (genotypes 15 and 17). They were able to survive in water despite the presence of phenolic compounds. Genotype 17 was never isolated from birds belonging to farm 2. Therefore, we might assume that it is an environmental non-colonizing strain. It is well known that environmental non-colonizing strains do exist (Messens et al., 2009; Perez-Boto et al., 2010). Strikingly, the other environmental genotype (genotype 15) had appeared in the birds from farm 2 three years before. The difficulty to state the direction of the contamination in environmental isolates is well known (Ridley et al., 2011); thus, it may be both from environment to the farms or vice versa. However, susceptibility data of the genotype 15 isolates point to an environmental origin. Genotype 15 from environment was pansusceptible, while the genotype 15 from poultry isolates were Q_R/Q_R-A_R. Since quinolone resistance in *Campylobacter* provides biological fitness in the mutants that harbour it (Luo et al., 2005), the acquisition and persistence of the resistance would be a more plausible event than the loss of the resistance.

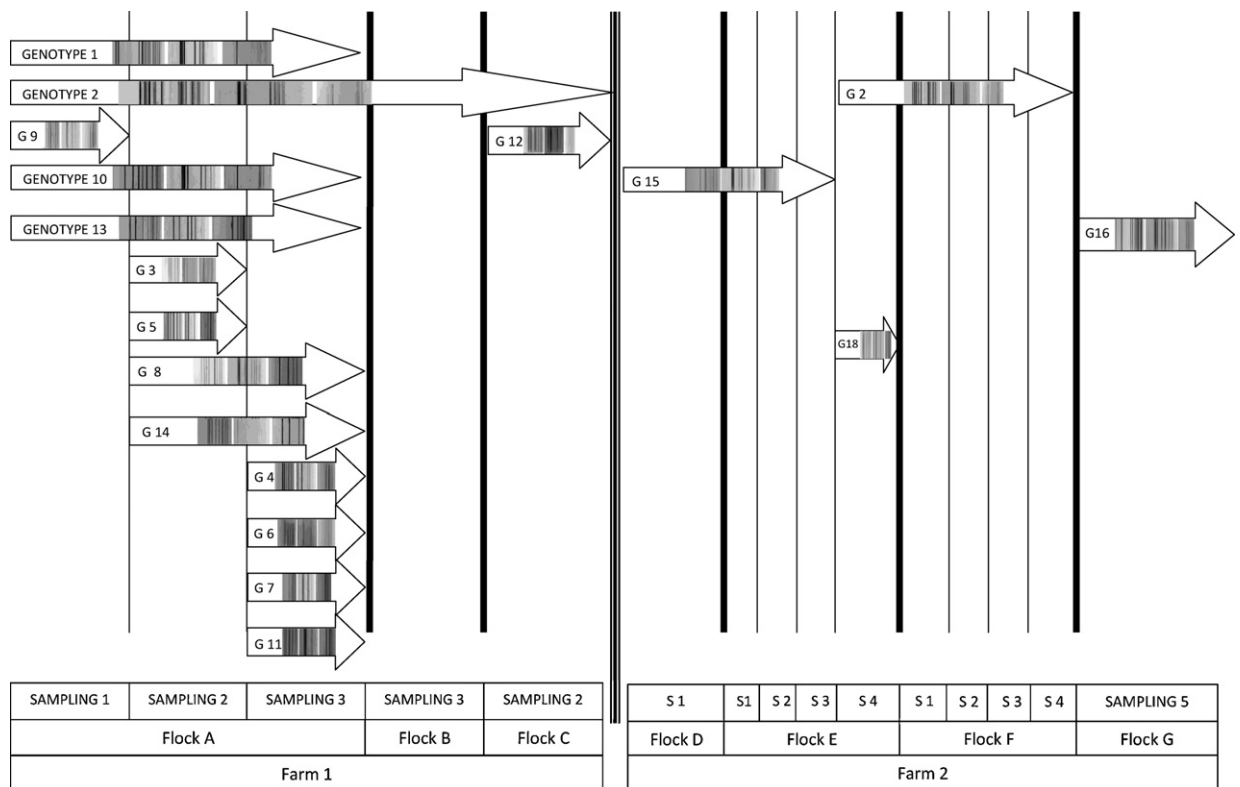


Fig. 3. Scheme depicting the evolution of the genotypes in farms 1 and 2. Vertical lines distinguish between sampling periods. Thick vertical lines distinguish between flocks. The extension of genotypes is indicated by arrows. Each genotype has been codified as G followed by the genotype number (i.e., G2 means genotype 2), and only a characteristic subtype of each genotype is represented. Only *Campylobacter* spp.-positive sampling periods are shown (S1, S2: sampling period).

With regard the antimicrobial resistance, the overall percentage of quinolone resistance (68.5%) in *C. jejuni* from the two farms was remarkable. It is important to note that quinolone resistance among *Campylobacter* of poultry origin has become a public health concern in many countries (Luo et al., 2005). Also the rate of tetracycline resistance (Tr) was considerable, but most of the TR isolates belonged to a single genotype, genotype 2, whose genetic stability and persistence has been shown. Therefore tetracycline resistance rate is reflecting somehow the success of that genotype colonizing the flock. Although there was a percentage of multidrug-resistant (MDR) strains to consider (6.1%), these strains were linked to a particular genotype that did not persist once the depopulation was carried out (genotype 13).

The resistotype has been shown to be applicable as an additional marker for the characterization of *Campylobacter* populations (Messens et al., 2009). In our study most of the genotypes possessed a stable profile of resistance without variations within the genotype. However, resistance profiles may vary along the study, for example; we found acquisitions of resistance (amoxycillin in genotype 15).

In conclusion, we have shown the complexity of the populations of *C. jejuni* in two grandparent broiler breeder farms. Despite the biosecurity measures, a relatively high prevalence of this pathogen was detected. Some strains were able to persist through time along the study.

Understanding the dynamics of the populations of *C. jejuni* within poultry farms would allow eradicating this pathogen from the food chain. The results point to an external, common environmental origin of some of the strains. Finally, monitoring of the populations of *Campylobacter* resistant to quinolones and tetracyclines should be a public health concern.

Acknowledgements

This work was funded by projects PI 02/26 and PI 05/00042 of the “Instituto de Salud Carlos III”. Iratxe Perez-Cobo, M. Dolores Hurtado-Pizarro, and Ignacio Varo from “Laboratorio Central de Veterinaria” are acknowledged for their technical support. We also thank Javier López and Isabella Ennemoser for reviewing the manuscript and their valuable suggestions. This publication made use of the *Campylobacter jejuni* Multilocus Sequence Typing website (<http://pubmlst.org/campylobacter/>) developed by Keith Jolley and sited at the University of Oxford (Jolley & Maiden 2010, BMC Bioinformatics, 11:595).

References

- Alter, T., Weber, R.M., Hamedy, A., Glunder, G., 2011. Carry-over of thermophilic *Campylobacter* spp. between sequential and adjacent poultry flocks. *Vet. Microbiol.* 147, 90–95.

- Collicott, K.A., Friethriksdottir, V., Reiersen, J., Lowman, R., Bisailon, J.R., Gunnarsson, E., Berndtson, E., Hiett, K.L., Needleman, D.S., Stern, N.J., 2006. Lack of evidence for vertical transmission of *Campylobacter* spp. in chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5794–5798.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), 2010. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline, second ed. CLSI Document M45-A2, Vol. 30. No. 18. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
- Colles, F.M., McCarthy, N.D., Layton, R., Maiden, M.C., 2011. The prevalence of *Campylobacter* amongst a free-range broiler breeder flock was primarily affected by flock age. *PLoS ONE* 6 (12), e22825.
- Dingle, K.E., McCarthy, N.D., Cody, A.J., Peto, T.E., Maiden, M.C., 2008. Extended sequence typing of *Campylobacter* spp., United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1620–1622.
- Fitzgerald, C., Helsel, L.O., Nicholson, M.A., Olsen, S.J., Swerdlow, D.L., Flahart, R., Sexton, J., Fields, P.I., 2001. Evaluation of methods for subtyping *Campylobacter jejuni* during an outbreak involving a food handler. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2386–2390.
- Friedman, C.R., Hoekstra, R.M., Samuel, M., Marcus, R., Bender, J., Shiferaw, B., Reddy, S., Ahuja, S.D., Helfrick, D.L., Hardnett, F., Carter, M., Anderson, B., Tauxe, R.V., 2004. Risk factors for sporadic *Campylobacter* infection in the United States: a case-control study in FoodNet sites. *Clin. Infect. Dis.* 38 (Suppl. 3), S285–S296.
- Gaudreau, C., Girouard, Y., Gilbert, H., Gagnon, J., Bekal, S., 2008. Comparison of disk diffusion and agar dilution methods for erythromycin, ciprofloxacin, and tetracycline susceptibility testing of *Campylobacter coli* and for tetracycline susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 4475–4477.
- Habib, I., Miller, W.G., Uyttendaele, M., Houf, K., De Zutter, L., 2009. Clonal population structure and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* in chicken meat from Belgium. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4264–4272.
- Hald, B., Skovgard, H., Pedersen, K., Bunkenborg, H., 2008. Influxed insects as vectors for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Danish broiler houses. *Poult. Sci.* 87, 1428–1434.
- Hiett, K.L., Stern, N.J., Fedorka-Cray, P., Cox, N.A., Musgrove, M.T., Ladely, S., 2002. Molecular subtype analyses of *Campylobacter* spp. from Arkansas and California poultry operations. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 6220–6236.
- Kudirkiene, E., Malakauskas, M., Malakauskas, A., Bojesen, A.M., Olsen, J.E., 2010. Demonstration of persistent strains of *Campylobacter jejuni* within broiler farms over a 1-year period in Lithuania. *J. Appl. Microbiol.* 108, 868–877.
- Kwan, P.S., Birtles, A., Bolton, F.J., French, N.P., Robinson, S.E., Newbold, L.S., Upton, M., Fox, A.J., 2008. Longitudinal study of the molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* in cattle on dairy farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3626–3633.
- Lehtopolku, M., Nakari, U.M., Kotilainen, P., Huovinen, P., Siitonen, A., Hakanen, A.J., 2010. Antimicrobial susceptibilities of multidrug-resistant *Campylobacter jejuni* and *C. coli* strains: in vitro activities of 20 antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 1232–1236.
- Luo, N., Pereira, S., Sahin, O., Lin, J., Huang, S., Michel, L., Zhang, Q., 2005. Enhanced in vivo fitness of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter jejuni* in the absence of antibiotic selection pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 541–546.
- Messens, W., Herman, L., De Zutter, L., Heyndrickx, M., 2009. Multiple typing for the epidemiological study of contamination of broilers with thermotolerant *Campylobacter*. *Vet. Microbiol.* 138, 120–131.
- Nachamkin, I., Bohachick, K., Patton, C.M., 1993. Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 31, 1531–1536.
- Newell, D.G., Fearnley, C., 2003. Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4343–4351.
- Ogden, I.D., MacRae, M., Johnston, M., Strachan, N.J., Cody, A.J., Dingle, K.E., Newell, D.G., 2007. Use of multilocus sequence typing to investigate the association between the presence of *Campylobacter* spp. in broiler drinking water and *Campylobacter* colonization in broilers. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5125–5129.
- On, S.L., Nielsen, E.M., Engberg, J., Madsen, M., 1998. Validity of *Sma*I-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by *Sa*II, *Kpn*I, and *Bam*HI polymorphisms: evidence of identical clones infecting humans, poultry, and cattle. *Epidemiol. Infect.* 120, 231–237.
- Perez-Boto, D., Garcia-Pena, F.J., Abad-Moreno, J.C., Hurtado-Pizarro, M.D., Perez-Cobo, I., Echeita, M.A., 2010. Drinking water as the source of *Campylobacter coli* infection in grandparent heavy breeders. *Avian Pathol.* 39, 483–487.
- Persson, S., Olsen, K.E., 2005. Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. *J. Med. Microbiol.* 54, 1043–1047.
- Petersen, L., Newell, D.G., 2001. The ability of Fla-typing schemes to discriminate between strains of *Campylobacter jejuni*. *J. Appl. Microbiol.* 91, 217–224.
- Peyrat, M.B., Soumet, C., Maris, P., Sanders, P., 2008. Phenotypes and genotypes of campylobacter strains isolated after cleaning and disinfection in poultry slaughterhouses. *Vet. Microbiol.* 128, 313–326.
- Ribot, E.M., Fitzgerald, C., Kubota, K., Swaminathan, B., Barrett, T.J., 2001. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1889–1894.
- Ridley, A.M., Morris, V.K., Cawthraw, S.A., Ellis-Iversen, J., Harris, J.A., Kennedy, E.M., Newell, D.G., Allen, V.M., 2011. Longitudinal molecular epidemiological study of thermophilic campylobacters on one conventional broiler chicken farm. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 98–107.
- Ring, M., Zychowska, M.A., Stephan, R., 2005. Dynamics of *Campylobacter* spp. spread investigated in 14 broiler flocks in Switzerland. *Avian Dis.* 49, 390–396.
- Wittwer, M., Keller, J., Wassenaar, T.M., Stephan, R., Howald, D., Regula, G., Bissig-Choisat, B., 2005. Genetic diversity and antibiotic resistance patterns in a campylobacter population isolated from poultry farms in Switzerland. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2840–2847.
- Yates, M.D., Drobniewski, F.A., Wilson, S.M., 2002. Evaluation of a rapid PCR-based epidemiological typing method for routine studies of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 40, 712–714.

Capítulo I

Artículo 2

“Drinking water as the source of *Campylobacter coli* infection in grandparent heavy breeders”

“El agua de bebida como la fuente de infección de *Campylobacter coli* en abuelas reproductoras pesadas”

Resumen del artículo:

Objetivos: Comparar los datos obtenidos de la aplicación de marcadores moleculares en las cepas de *Campylobacter* aisladas de las aves de dos granjas de recría de abuelas reproductoras con los datos obtenidos en las cepas aisladas en el depósito de agua que abastece a ambas granjas. Por tanto, establecer la relación epidemiológica entre ellas y determinar si el agua de bebida es la fuente de colonización de *Campylobacter* en las aves de este estudio.

Métodos: En las granjas de recría (R-1 y R-2), las aves permanecen desde el primer día de vida hasta la semana 20, donde son trasladadas a las granjas de abuelas. La diferencia de edad en las aves de las dos granjas es de 12 semanas. De forma rutinaria se realizaron muestreos (1 hisopo por ave, 1 colonia por hisopo sembrado) en el periodo de aclarado de las granjas (6 semanas de vida) siempre negativos hasta este estudio. Tras la detección de *Campylobacter* spp. en el cultivo de hisopos cloacales de aves de la granja R-2, se realizaron muestreos del agua de bebida (abastece a R-1 y R-2) y también de las aves de la granja R-1. Al ser ambos muestreos positivos, se realizó una toma de muestras adicional en las aves de la granja R-2 (9 semanas de vida). En todas las cepas aisladas, se determinaron las especies implicadas y se genotiparon mediante los marcadores moleculares: *KpnI*-PFGE, *SmaI*-PFGE y RFLP-PCR del gen *flaA*, así como por *MultiLocus Sequence Typing* (MLST). Se realizó una comparación de los genotipos obtenidos para dilucidar las relaciones entre las cepas.

Resultados: Tanto en los muestreos de las aves, como en los del agua, se hallaron dos especies de *Campylobacter*: *C. jejuni* y *C. coli* (esta última aislada en un mayor número de aves). Las aves de las dos granjas compartían dos genotipos comunes, uno de ellos para la especie *C. jejuni* y el otro para *C. coli*. Pero solamente el genotipo de *C. coli* fue encontrado en el agua de bebida. Se confirmó que las cepas de *C. coli* aisladas de las aves de las dos granjas así como las aisladas en el agua de bebida poseían el mismo secuenciotipo por la técnica de

MLST (ST-827). La población mayoritaria de *Campylobacter* (*C. jejuni*) aislada en el agua de bebida (se estudiaron 10 colonias del muestreo positivo del agua) no fue detectada en las aves de las dos granjas y no poseía una semejanza mayor del 85% con ninguna de las demás poblaciones bacterianas, además, su secuenciotipo ha sido el primero descrito en la base de datos internacional hasta la fecha (ST-1682).

Conclusiones: Este trabajo muestra cómo mediante el estudio de marcadores moleculares podemos investigar las fuentes de colonización de *Campylobacter* en las granjas de aves de consumo. En contra a lo que ha sucedido de forma general a lo largo del estudio que da origen a esta tesis, las granjas de recría fueron positivas para *Campylobacter*. Además, y también en contra de los resultados generales del estudio, la especie mayoritaria fue *Campylobacter coli*. Se pudo determinar que el pozo que abastece de agua de bebida a las granjas era el origen de *C. coli*, lo que indica que la bacteria resistió las medidas de higienización del agua de bebida (cloración). No se pudo determinar el origen de la población de *C. jejuni* que colonizó las aves en ambas granjas, por lo que quizás existen otras fuentes no detectadas. Finalmente, se describió una población de *C. jejuni* en el agua de bebida (mayoritaria en ella) que no colonizaba las aves, indicando una característica ambiental de la misma.

Claves del artículo y relación con los objetivos planteados

1. En contra de lo habitual a lo largo del estudio, aparece colonización en granjas de recría y por tanto, en edades tempranas de las aves. Relacionado con el objetivo 1.1, existe una influencia entre edad de las aves y prevalencia de *Campylobacter*.
2. Los lotes de aves se colonizaron en un porcentaje mayor por *Campylobacter coli*. A diferencia de lo más habitual en esta Tesis, donde *C. jejuni* es la especie mayoritaria. Relacionado con el Objetivo 1.1, especies que colonizan las granjas españolas del estudio.
3. Identificada una fuente de colonización ambiental para *C. coli* común a las dos granjas estudiadas. Como en el primer artículo, el reservorio o fuente de infección de la cepa es una matriz o medio de tipo acuático. En este caso fue el agua de bebida, indicando un fallo en las medidas de cloración del agua o una contaminación masiva de la misma. Relacionado con el Objetivo 1.2, identificando una fuente de infección de *Campylobacter* en aves de consumo.
4. Se ha identificado un genotipo de cepas de *C. jejuni* mayoritario en el ambiente que posteriormente no colonizó las aves. Posibilidad de cepas ambientales de *Campylobacter* no colonizadoras. Relacionado con el Objetivo 1.2, comportamiento de las poblaciones bacterianas de *Campylobacter*.

Drinking water as the source of *Campylobacter coli* infection in grandparent heavy breeders

David Pérez-Boto^{1*}, Francisco J. García-Peña², Juan C. Abad-Moreno³,
M. Dolores Hurtado-Pizarro², Iratxe Pérez-Cobo² and M. Aurora Echeita¹

¹Instituto de Salud Carlos III, Centro Nacional de Microbiología, Servicio de Bacteriología, Laboratorio de *Campylobacter*, Ctra. Majadahonda-Pozuelo Km. 2.5, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain, ²Laboratorio Central de Veterinaria, Dpto. Bacteriología, Ctra. Madrid-Algete Km. 8.00, 28110 Algete, Madrid, Spain, and ³Cobb España, C/Varsovia 3, 28805 Alcalá de Henares, Madrid, Spain

The aim of the present study was the molecular identification of a common source of infection of *Campylobacter coli* in two grandparent breeder farms. *Campylobacter jejuni* and *C. coli* were isolated from well water and cloacal swabs from grandparent chickens. Colonies were genotyped using restriction fragment length polymorphism-*flaA* gene, pulsed field gel electrophoresis and multi-locus sequence typing. The same genotype of *C. coli* was found in both farms and in the well from which drinking water was supplied to the farms. The well water was epidemiologically linked as the source of *C. coli* infection. The molecular identification for epidemiological source-tracking of *C. coli* in breeder farms could aid in combating the colonization of this pathogen and therefore to reduce their incidence in human campylobacteriosis.

Introduction

Thermophilic members of *Campylobacter* are recognized as the main cause of bacterial acute gastroenteritis in man in most of the industrialized countries (Galanis, 2007). The most common species reported is *Campylobacter jejuni* (80 to 90% of cases) (Janssen *et al.*, 2008) followed by *Campylobacter coli* (18.6%) (Gürtler *et al.*, 2005). Chicken products remain the primary source of infection (Vellinga & Van Looek, 2002; Kapperud *et al.*, 2003). The reduction and/or elimination of *Campylobacter* spp. from chicken products is a major strategy in the efforts to control this disease. Therefore, it is crucial to ascertain the sources of infection for chicken farms as well as finding control measures to prevent colonization. The tight biosecurity measures and the breeding conditions in grandparent breeder farms make them good scenarios in the search for possible sources of infection.

According to different studies, infection on chicken farms could enter the flock by vertical transmission from parent flocks (Cox *et al.*, 2002), or by horizontal transmission via different sources (Pearson *et al.*, 1993; van de Giessen *et al.*, 1998; Petersen & Wedderkopp, 2001; Hiett *et al.*, 2002; Hansson *et al.*, 2007). Groundwater is frequently used as drinking water in poultry farms. Several studies have been conducted to prove whether contaminated groundwater was the source of *Campylobacter* spp. in poultry flocks, and most studies have shown evidence of the involvement of groundwater as a possible source of infection (Pearson *et al.*, 1993; Stanley *et al.*, 1998; Zimmer *et al.*, 2003). Recently Ogden *et al.* (2007), using multi-locus sequence typing (MLST) as a molecular marker, have found the same

C. jejuni sequence types both in water tanks and broiler farms, showing the possibility of water as a source of infection in broilers.

The aim of the present study was to determine whether the drinking water was the source of *C. coli* infection in two grandparent heavy breeder flocks by demonstrating that the species and genotype of strains found in the drinking water were identical to those isolated from the chickens.

Materials and Methods

Rearing farms. The samples were taken in two rearing farms of grandparent heavy breeders located in a central region of Spain. The rearing farms are identified as R-1 and R-2, and the distance between the two is approximately 500 m. Farm R-1 is comprised of two sheds and Farm R-2 of three sheds. Around the rearing farms there are five production farms separated by a distance of about 3 km, without a common source of water, farm staff and equipment to the rearing farms. There are no other farms of other livestock in the region.

Both rearing and production farms have very strict biosecurity procedures. The vehicles entering the farm are thoroughly cleaned and disinfected. The farm staff follow tight biosecurity practices with showers and change of clothing, including boots, at the main entrance of the farm and another change of boots at each chicken house. Each farm has its own staff and equipment. Windows and ventilation systems are covered by a mesh in order to avoid the entrance of insects and droppings of wild birds. The birds remain on the rearing farms from their first day of life until the age of 20 weeks, when they are moved to the production farms. The difference in age between the flocks reared in the two rearing farms was 12 weeks. When the farm is empty, the litter is removed by lorry, the feed belts and bell drinkers are removed and thoroughly cleaned and disinfected.

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +34 918223710. Fax: +34 915097966. E-mail: dpboto@isciii.es
David Pérez-Boto and Francisco J. García-Peña contributed equally to this work.

Received 17 July 2010

ISSN 0307-9457 (print)/ISSN 1465-3338 (online)/10/060483-05 © 2010 Houghton Trust Ltd
DOI: 10.1080/03079457.2010.518138

The water used in both farms comes from a well with a depth of 15 m with the borehole covered with a metal lid. This well is located on Farm R-2, at a distance of about 20 m from the sheds. A pump at the top of the borehole fills a tank with a capacity of 17 m³. The pump starts to work when the water level drops and thus keeps the level constant. The well and tank are located inside a small building to prevent contamination of the water as a consequence of contact with wild birds or other animals. This tank is shared by both rearing farms. The drinking water is not used for human consumption.

The water is sanitized by an automatic chlorination system that works by pulse dosage. When the pump starts to work, the system pours the appropriate volume of a sodium hypochlorite solution into the water tank in order to achieve a level of free chlorine between 2 and 3 ppm at the end of the drinker lines. From the tank the water is distributed to both rearing farms through polyethylene pipes using a pressure pump that sends the water (pressure level, 4 to 5 bars) to a 500 l steel tank. When the water reaches the shed it is distributed through a polyvinyl chloride pipe at a minimum pressure of 5 bars. The quantity of water consumed in each shed is controlled by a flowmeter and there is one electrovalve that can be used to ration the water, depending on the needs of the poultry and seasonal variations. Inside the sheds there is one polyvinyl chloride pipe that branches into a number of pipes where the bell drinkers are located. There are four drinking lines inside each shed.

Water samples. One sample of 20 l water was taken aseptically from the pipe connected to the pump of the well that pours into the tank shared by the two rearing farms (R-1 and R-2). The sample was collected in two sterile 10 l opaque plastic containers and was transported at a temperature of 4°C to the laboratory and analysed within 6 h.

Analysis of water samples. The samples were analysed according to the Food and Drug Administration *Analytical Manual* (<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM072616>). Briefly, the water was filtered using a peristaltic pump through positively charged 0.45 µm diameter Zetapor filters (Cuno, Meriden, CT, USA). The filters were cut up into small pieces and cultured in 100 ml Bolton broth (CM0983B; Oxoid, Madrid, Spain). The broth was incubated for 3 h at 30°C, then at 37°C for a further 2 h, and finally at 42°C for 48 h. All incubations were carried out under microaerobic conditions (Campygen 3.5 L; Oxoid).

After both 24 and 48 h of incubation, 100 µl Bolton broth was streaked onto one plate of Karmali agar (CM0935B; Oxoid) and another plate of Abeyta-Hunt-Bark agar (according to the Food and Drug Administration). The plates were incubated for 48-h periods at 42°C in a microaerobic environment. Subsequently, the suspected colonies were selected and streaked on blood agar plates (Mueller-Hinton agar supplemented with 5% sheep blood; Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany) for their identification using biochemical tests.

Cloacal swabs. Since 2001, samples have been taken for surveillance from 60 birds in each flock when the selection of males takes place (5 to 7 weeks of age) and when the birds are moved to the production farm (18 to 20 weeks of age). In the present study, a similar sampling procedure had been applied from Farm R-2 (6 weeks of age) and 1 week later from Farm R-1 (19 weeks of age). Related to the positive results obtained in the analyses from Farm R-1 and from the water samples collected 1 week later, another 60 cloacal swabs were taken from birds in Farm R-2 (9 weeks of age) 1 week after collecting the water samples. The swabs were placed in a Cary-Blair transport medium and sent to the laboratory. All samples were cultivated within 6 h. Each swab was streaked on Karmali agar and Abeyta-Hunt-Bark agar. The plates were incubated for 48 h at 42°C under microaerobic conditions. Subsequently, the suspect colonies were collected and streaked on blood agar plates for identification.

Morphological, biochemical, and polymerase chain reaction identification. The suspect colonies, one selected from each cloacal swab, were identified as *Campylobacter* spp. when the organisms showed the typical curved or “seagull” morphology under microscopic observation, after staining for 3 min with 50% crystal violet in distilled

water, and were positive in oxidase and catalase tests. Finally, the isolates were identified by means of the hippurate hydrolysis test. Colonies with a negative or doubtful result for the hippurate test were identified at the species level with a previously described multiplex polymerase chain reaction (PCR) (Persson & Olsen, 2005).

Genotyping. Molecular characterization of strains was carried out using a combination of: firstly, PCR amplification of the *flaA* gene, followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the PCR products obtained using *DdeI* (RFLP-*flaA*); secondly, DNA macro-restriction analysis by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) using two different restriction enzymes (*SmaI* and *KpnI*); and thirdly, by MLST of seven housekeeping genes.

RFLP-*flaA* typing. The DNA template was obtained using a simple DNA extraction procedure (Yates *et al.*, 2002). PCR amplification was performed with a Ready-to-Go system (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). RFLP-*flaA* with the restriction enzyme *DdeI* (Roche, Madrid, Spain) was performed following the Campynet protocol (Harrington *et al.*, 2003).

Pulsed field gel electrophoresis typing. Preparation of *Campylobacter* DNA was performed by the Pulsenet protocol (Ribot *et al.*, 2001). PFGE by *SmaI* (Roche) was also performed by the Pulsenet protocol and by *KpnI* (Takara, Conda, Madrid, Spain) using the protocol of On *et al.* (1998). PFGE profiles were assigned to pulsotypes on the basis of one or more band difference between strains.

Computer-assisted analysis of fingerprinting experiments. All of the fingerprinting experiments—RFLP-*flaA*, PFGE-*SmaI* and PFGE-*KpnI*—were analysed with a global comparison using an average estimation from experiments using the InfoQuest FP software (Bio-Rad, Madrid, Spain). The dendrogram was constructed using the unweighted pair group method of averages.

Multi-locus sequence typing amplification and sequencing. MLST was performed as previously described (Dingle *et al.*, 2001). All allelic sequences were compared against the *C. jejuni/C. coli* MLST database (<http://pubmlst.org/campylobacter/>). Novel sequences were entered into the MLST database and assigned new allele numbers. Clonal complexes were defined as groups of two or more independent strains that shared identical alleles at five or more loci; each complex was named after the putative founder sequence type.

Results

The results reported here were obtained in 2004; all previous flocks since 2001 had been negative for campylobacter. A total of 91 isolates were obtained from the chicken cloacal swabs. The prevalence was about 90% in Farm R-1 (54 positive out of 60 samples) and 61.7% in Farm R-2 (37 out of 60 samples). The organisms in all colonies showed the typical curved or seagull shape under microscopy, they were positive in oxidase and catalase tests, and were identified as *C. jejuni* (38 colonies) or *C. coli* (53 colonies). Our investigations also revealed that both species were found in all of the sheds at the two farms. One week after isolating *Campylobacter* spp. on Farm R-1 and 1 week before isolating *Campylobacter* spp. on Farm R-2, we isolated *Campylobacter* spp. from the well water. Twenty suspect colonies of *Campylobacter* spp. were chosen from the Karmali and Abeyta-Hunt-Bark agar plates, which had been cultured from Bolton broth inoculated with the 0.45 µm water filters. Thirteen and seven colonies were identified as *C. jejuni* and *C. coli*, respectively.

The number of *C. jejuni* and *C. coli* colonies, the genotypes found, and the number of strains belonging to each genotype are summarized in Table 1. In each farm, there were no differences among the distribution of the genotypes from the sheds. The relationship between different strains determined by PFGE using *SmaI* and *KpnI* and RFLP of the *flaA* gene is shown in Figure 1. The *C. coli* genotype RFLP-*flaA2-Sma2-Kpn2-ST827* was the only one found in both the well water and the two rearing farms. Two *C. jejuni* strains isolated from chickens on rearing Farm R-1 and 13 strains from Farm R-2 had the same genotype RFLP-*flaA3-Sma3-Kpn3-ST46*. However, strains of this genotype were not isolated from the drinking water.

Discussion

A *C. coli* clone was isolated from the water supply of two chicken rearing farms (Farms R-1 and R-2) during summer 2004. The same *C. coli* genotype had been isolated 1 week before from chicken cloacal swabs from Farm R-1. Farm R-2 was negative for *Campylobacter* spp. 1 week before the positive results in rearing Farm R-1, but 1 week after the water sampling the same *C. coli* genotype was isolated from chicken cloacal swabs from Farm R-2.

Chickens are not the main host for *C. coli*, which shows a preference for swine or cattle (Botteldoorn *et al.*, 2001; Oporto *et al.*, 2007), although some studies have shown that *C. coli* is capable of colonizing chickens efficiently (Bull *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2006). This fact is proven in our study, in which *C. coli* appeared in a higher percentage of chickens than *C. jejuni*.

It would be difficult to identify the origin of the *C. coli* strain found in the drinking water. Firstly, the well and header tank are located inside a building and the borehole was fitted with a lid, which always remains closed. Therefore the contamination by *Campylobacter* from within the sheds or from non-water vectors would be difficult. Secondly, it is unlikely that contamination of the water came from the population of birds inside the poultry farm because the bacteria would have had to track back upstream against the water flow. Therefore, there is a strong possibility that the water was contaminated before entering the header tank.

The MLST data do not allow one to establish a host association between the *C. coli* strains isolated from water and birds. They belong to a clonal complex (ST

-828 clonal complex) that includes strains isolated from many different sources, including cattle, chickens, pigs, and humans among others.

Most of the strains isolated from water belonged to the *C. jejuni* genotype *fla1-Sma1-Kpn1-ST1682*. The new ST1682 was detected for the first time in our study. This ST was not isolated from birds, and its ability to colonize birds has not yet been studied. *C. jejuni* strains with the *fla3-Sma3-Kpn3-ST46* genotype were isolated from chickens from both rearing farms. The fact that they were isolated on both farms points to a common source. This genotype was not isolated from the water samples, either because it was not there, the concentration was too low for detection, or the strains were in a viable but non-culturable form.

It is very difficult to specify the possible origin of the remaining genotypes isolated from chickens in the two rearing farms (*fla1-Sma4-Kpn4-ST572* and *fla4-Sma5-Kpn5-ST45*). The first genotype shares the same *flaA* type with one of the water genotypes, but the remaining markers (as seen in Figure 1) did not possess any similarity. However, it is likely that the water supply was also the source of these strains if we take into account the strict biosecurity measures on both farms.

With regard to the water sanitization measures, the water was treated with a sodium hypochlorite solution in order to achieve a level of free chlorine between 2 and 3 parts/10⁶ at the end of the drinker lines. However, this treatment proved ineffective in preventing infection of the chickens or reducing the proportion of chickens colonized. These results are in accordance with previous studies about the influence of chlorination in delaying the onset or decreasing the prevalence of colonization in the treated flocks as compared with the control flocks (Stern *et al.*, 2002). After the infection, the chlorination system was revised and the dosage was enhanced. The well was not closed because it is the only source of water for these farms. Since then, *C. coli* has not been isolated from the farms.

To our knowledge, this is the first time that the same *C. coli* strains have been isolated from groundwater and from chickens using the groundwater as drinking water. The strains isolated from birds and water belong to the same clone because the patterns obtained with four molecular methods are nearly the same, and therefore we have shown that drinking water is one of the sources of *C. coli* on chicken farms.

Table 1. Distribution of *Campylobacter* spp. genotypes isolates according to DdeI RFLP of the *flaA* gene, PFGE-SmaI, PFGE-KpnI and MLST alleles and corresponding sequence types.

Sample	Age	Number of colonies	Species	Number of strains	RFLP- <i>flaA</i>	PFGE		MLST								Sequence type
						<i>Sma</i> I	<i>Kpn</i> I	<i>aspA</i>	<i>glnA</i>	<i>gltA</i>	<i>glyA</i>	<i>pgm</i>	<i>tkf</i>	<i>uncA</i>		
Well water	—	20	CJ	13	1	1	1	10	186	2	62	260 ^a	223	6	1682 ^a	
			CC	7	2	2	2	33	39	30	82	104	56	17	827	
Farm R-1	19 weeks	54	CJ	16	1	4	4	62	4	5	2	2	1	5	572	
			CJ	2	3	3	3	2	21	5	3	2	1	5	46	
			CC	36	2	2	2	33	39	30	82	104	56	17	827	
Farm R-2	9 weeks	37	CJ	7	4	5	5	4	7	10	4	1	7	1	45	
			CJ	13	3	3	3	2	21	5	3	2	1	5	46	
			CC	17	2	2	2	33	39	30	82	104	56	17	827	

CJ, *C. jejuni*; CC, *C. coli*. ^aThe *pgm* allele and sequence type first described in this survey.

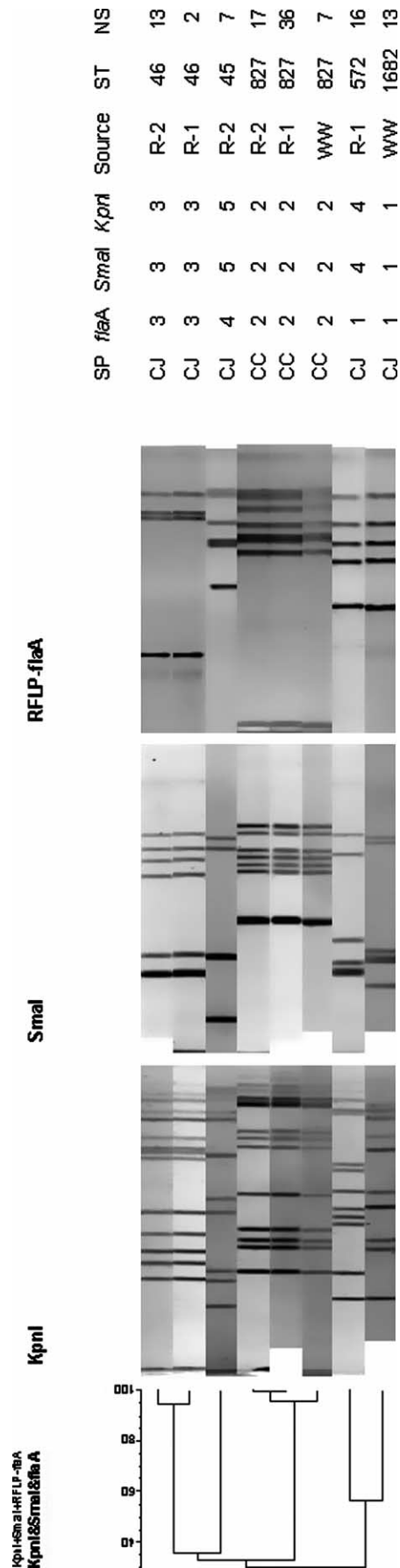


Figure 1. Dendrogram showing the relatedness among the strains using all of the fingerprinting experiments with a global comparison. Dendrogram constructed with the unweighted pair group method of averages. CJ, *C. jejuni*; CC, *C. coli*; ST, sequence type using MLST; NS, number of strains isolated with this genotype; R-1 and R-2, farms; WW, well water.

Acknowledgements

The present study was supported in part by grant P.I. 02/26 from the Instituto de Salud Carlos III (Spain). This publication used the *Campylobacter* Multi Locus Sequence Typing database developed by Keith Jolley and Man-Sue Chan from the University of Oxford. The authors gratefully thank Patricia Sánchez Barreno for her comments and suggestions, and Susana Pedraza Díaz for her critical revision of the manuscript.

References

- Botteldoorn, N., Heyndrickx, M., Rijpens, N. & Herman, L. (2001). Prevalence of *Salmonella*, *Campylobacter* and VTEC on pig farms. *Mededelingen (Rijksuniversiteit te Gent Fakulteit van de Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen)*, 66, 373–380.
- Bull, S.A., Allen, V.M., Domingue, G., Jorgensen, F., Frost, J.A., Ure, R. & Humphrey, T.J. (2006). Sources of *Campylobacter* spp. colonizing housed broiler flocks during rearing. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 645–652.
- Cox, N.A., Stern, N.J., Hiett, K.L. & Berrang, M.E. (2002). Identification of a new source of *Campylobacter* contamination in poultry: transmission from breeder hens to broiler chickens. *Avian Diseases*, 46, 535–541.
- Dingle, K.E., Colles, F.M., Wareing, D.R., Ure, R., Fox, A.J., Bolton, F.E. & Maiden, M.C. (2001). Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 14–23.
- Galanis, E. (2007). *Campylobacter* and bacterial gastroenteritis. *Canadian Medical Association Journal*, 177, 570–571.
- Gürtler, M., Alter, T., Kasimir, S. & Fehlbauer, K. (2005). The importance of *Campylobacter coli* in human campylobacteriosis: prevalence and genetic characterization. *Epidemiology and Infection*, 133, 1081–1087.
- Hansson, I., Vagsholm, I., Svensson, L. & Olsson Engvall, E. (2007). Correlations between *Campylobacter* spp. prevalence in the environment and broiler flocks. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 640–649.
- Harrington, C.S., Moran, L., Ridley, A.M., Newell, D.G. & Madden, R.H. (2003). Inter-laboratory evaluation of three flagellin PCR/RFLP methods for typing *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: the CAMPYNET experience. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 1321–1333.
- Hiett, K.L., Stern, N.J., Fedorka-Cray, P., Cox, N.A., Musgrove, M.T. & Ladely, S. (2002). Molecular subtype analyses of *Campylobacter* spp. from Arkansas and California poultry operations. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 6220–6236.
- Janssen, R., Krogfelt, K.A., Cawthraw, S.A., van Pelt, W., Wagenaar, J.A. & Owen, R.J. (2008). Host–pathogen interactions in *Campylobacter* infections: the host perspective. *Clinical Microbiology Reviews*, 21, 505–518.
- Kapperud, G., Espeland, G., Wahl, E., Walde, A., Herikstad, H., Gustavsen, S. & Digraanes, A. (2003). Factors associated with increased and decreased risk of *Campylobacter* infection: a prospective case-control study in Norway. *American Journal of Epidemiology*, 158, 234–242.
- Miller, W.G., Englen, M.D., Kathariou, S., Wesley, I.V., Wang, G., Pittenger-Alley, L.S. & Mandrell, R.E. (2006). Identification of host-associated alleles by multilocus sequence typing of *Campylobacter coli* strains from food animals. *Microbiology*, 152, 245–255.
- Ogden, I.D., MacRae, M., Johnston, M., Strachan, N.J., Cody, A.J., Dingle, K.E. & Newell, D.G. (2007). Use of multilocus sequence typing to investigate the association between the presence of *Campylobacter* spp. in broiler drinking water and *Campylobacter* colonization in broilers. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5125–5129.
- On, S.L., Nielsen, E.M., Engberg, J. & Madsen, M. (1998). Validity of SmaI-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by *SalI*, *KpnI*, and *BamHI* polymorphisms: evidence of identical clones infecting humans, poultry, and cattle. *Epidemiology and Infection*, 120, 231–237.
- Oporto, B., Esteban, J.I., Aduriz, G., Juste, R.A. & Hurtado, A. (2007). Prevalence and strain diversity of thermophilic campylobacters in cattle, sheep and swine farms. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 977–984.
- Pearson, A.D., Greenwood, M., Healing, T.D., Rollins, D., Shahamat, M., Donaldson, J. & Colwell, R.R. (1993). Colonization of broiler chickens by waterborne *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 987–996.
- Persson, S. & Olsen, K.E. (2005). Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. *Journal of Medical Microbiology*, 54, 1043–1047.
- Petersen, L. & Wedderkopp, A. (2001). Evidence that certain clones of *Campylobacter jejuni* persist during successive broiler flock rotations. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2739–2745.
- Ribot, E.M., Fitzgerald, C., Kubota, K., Swaminathan, B. & Barrett, T.J. (2001). Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 1889–1894.
- Stanley, K., Cunningham, R. & Jones, K. (1998). Isolation of *Campylobacter jejuni* from groundwater. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 187–191.
- Stern, N.J., Robach, M.C., Cox, N.A. & Musgrove, M.T. (2002). Effect of drinking water chlorination on *Campylobacter* spp. colonization of broilers. *Avian Diseases*, 46, 401–404.
- Van de Giessen, A.W., Tilburg, J.J., Ritmeester, W.S. & Van der Plas, J. (1998). Reduction of *Campylobacter* infections in broiler flocks by application of hygiene measures. *Epidemiology and Infection*, 121, 57–66.
- Vellinga, A. & Van Look, F. (2002). The dioxin crisis as experiment to determine poultry-related *Campylobacter* enteritis. *Emerging Infectious Diseases*, 8, 19–22.
- Yates, M.D., Drobniowski, F.A. & Wilson, S.M. (2002). Evaluation of a rapid PCR-based epidemiological typing method for routine studies of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 712–714.
- Zimmer, M., Barnhart, H., Idris, U. & Lee, M.D. (2003). Detection of *Campylobacter jejuni* strains in the water lines of a commercial broiler house and their relationship to the strains that colonized the chickens. *Avian Diseases*, 47, 101–107.

Capítulo I

Artículo 3

“Prevalence and characterization of a clonal group of *Campylobacter coli* with common flaA type among isolates of chicken and human origin in Spain”

“Prevalencia y caracterización de un grupo clonal de *Campylobacter coli* con un tipo flaA común entre aislados de origen aviar y humano en España”

Resumen del artículo:

Objetivos: Realizar una búsqueda de clones comunes a cepas aviarias y de origen clínico (pacientes hospitalizados por campilobacteriosis). Diversos autores han publicado que la especie *Campylobacter coli* posee un carácter más clonal que *C. jejuni*, por lo que centramos nuestra búsqueda en esta especie. La búsqueda se realizó partiendo de un marcador molecular sencillo (RFLP-PCR del gen *flaA*) para el que se detectó un tipo bastante frecuente entre las cepas de *C. coli* de ambos orígenes (aviar y clínico) y que se hallaba casi exclusivamente en esta especie.

Métodos: Las cepas de origen clínico, de forma rutinaria, se tipifican mediante el RFLP-PCR del gen *flaA*. Los perfiles de bandas obtenidos con esta técnica (tipos flaA) dentro de la especie *C. coli* en cepas de origen aviar (granjas de dos etapas iniciales de la producción de *broilers*) se compararon con los de las cepas recibidas de diferentes hospitales españoles a lo largo del periodo 2002-2007. Las cepas seleccionadas de ambos orígenes que compartían el mismo tipo flaA fueron tipificadas con diferentes marcadores moleculares, basados en perfiles de bandas: *Bam*HI-PFGE y *Sma*I-PFGE, y basados en secuenciación: SVR-*flaA* y MLST. De forma adicional, y dado que se ha mostrado de utilidad en diferentes estudios, se incluyó también el perfil de resistencias a antimicrobianos (resistotipo).

Resultados: Se encontró un tipo flaA (flaA 36), común a cepas de ambos orígenes y con una frecuencia notable dentro de las cepas de origen clínico identificadas como *C. coli* (13.55% para el periodo 2002-2007). En total se seleccionaron 54 cepas, nueve de ellas de origen aviar y 45 de origen clínico, dos cepas se identificaron como *C. jejuni*, pese a poseer el tipo flaA 36. La comparación de los 54 aislados de ambos orígenes mediante PFGE dio lugar a un cluster

de 41 cepas que incluía todas las cepas de origen aviar (excepto una identificada como *C. jejuni*). La comparación conjunta de las secuencias de los alelos de MLST y de SVR-*flaA* dio lugar a un cluster que incluía las cepas de origen aviar y que era de menor tamaño que el formado por los perfiles de PFGE, debido a que la secuencia del SVR-*flaA* es muy variable. La variabilidad del marcador SVR-*flaA* se refleja en nuestro estudio, en el que se describen hasta diez alelos diferentes para un solo tipo *flaA*, aunque finalmente dan lugar a dos péptidos (péptidos 1 y 10, con un solo aminoácido de diferencia). En cuanto al estudio por MLST, todas las agrupadas por PFGE pertenecieron al secuenciotipo ST-827. Hubo una excepción, ya que una de las cepas no perteneció a este secuenciotipo, pero las diferencias con ST-827 son en un solo nucleótido en uno de los alelos. El secuenciotipo ST-827 no se asocia a ningún hospedador específico en la base de datos pública (<http://pubmlst.org/campylobacter/>), pero sí se observa que se aísla frecuentemente del hombre (casos clínicos). En cuanto a los resistotipos, se observa más variación (hasta seis diferentes dentro del *cluster* formado por la comparación de perfiles de PFGE), pero destaca la prevalencia de la resistencia a tetraciclina y ciprofloxacino dentro del cluster y de forma global en todas las cepas tipo *flaA* 36 (87.03% resistencia a tetraciclina y 61.1% de resistencia a ciprofloxacino).

Conclusiones: Partiendo del estudio de un marcador molecular sencillo como es el RFLP-PCR del gen *flaA* (tipos *flaA*) se ha podido detectar un grupo clonal de *Campylobacter coli* común en cepas de pollo y humano. Este grupo clonal se ha mantenido estable a lo largo del periodo 2002-2007, y además diseminado por diferentes provincias españolas. Es destacable la prevalencia de la resistencia a tetraciclina en el grupo clonal aunque el resistotipo es variable, ya que la presión antibiótica no ha tenido porqué ser igual para todas las cepas. Se puede definir al grupo clonal como Tipo *flaA* 36-ST827-*flaA* péptido 1.

Claves del artículo y relación con los objetivos planteados

1. El uso del marcador RFLP-PCR del gen *flaA* se ha mostrado de utilidad para iniciar estudios epidemiológicos, haciendo una preselección de cepas que ahorra tiempo y costes.
2. Prevalencia destacable (13.55%) de un solo tipo *flaA* (tipo *flaA* 36) entre las cepas de *Campylobacter coli* de origen clínico en el periodo 2002-2007 en España.
3. Aún con ligeras variaciones, mediante el uso de diferentes marcadores moleculares (PFGE, MLST, SVR-*flaA*) se consigue agrupar las cepas de origen avícola con las de origen humano de un modo muy homogéneo. El resistotipo en cambio, se ha mostrado más variable.
4. Se ha conseguido identificar un grupo clonal común para *C. coli* ligando epidemiológicamente cepas de origen avícola y humano. Hemos podido, por tanto, demostrar de forma indirecta la posibilidad de que cepas de nuestro estudio aisladas en aves pueden ser patógenas para el hombre. El grupo clonal puede definirse por tipo *flaA* 36-ST827-*flaA* péptido 1.
5. Se confirma, como indica la base de datos pública de MLST y algunos autores, que el secuenciotipo ST827 es muy prevalente entre las cepas de *C. coli* de origen clínico.
6. Dos cepas fueron identificadas como *C. jejuni* pese a tener el tipo *flaA* 36, lo que puede indicar el intercambio alélico entre ambas especies.
7. Un porcentaje importante de cepas de este grupo clonal son resistentes a tetraciclina, lo cual es de interés en Salud Pública. Las variaciones en el resto de resistencias pueden deberse a que no están todas sometidas a la misma presión selectiva por uso de antibióticos.

Title

Prevalence and characterization of a clonal group of *Campylobacter coli* with common *flaA* type among isolates of chicken and human origin in Spain

Authors

David Pérez-Boto^{*1}, Silvia Herrera-León¹, Juan Carlos Abad-Moreno², Francisco Javier García-Peña³, Cristina Simón¹, José Antonio López-Portolés¹, and M. Aurora Echeita¹

1 Unidad de Enterobacterias, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid. Spain. 2 Laboratorio Central de Veterinaria. Dpto. Bacteriología, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Algete, Madrid. Spain. 3 COBB España. Alcalá de Henares, Madrid. Spain

* Corresponding Author mailing address: Sección de Microbiología Alimentaria. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). Ministerio de Sanidad, Asuntos Sociales e Igualdad. Ctra. Majadahonda-Pozuelo, km.2, Majadahonda, Madrid 28220. Spain. Phone:+34 913380989. Fax:+34 915097913. E-mail: dperez@externos.msssi.es

Abstract

Campylobacter coli strains of chicken origin have been linked with human cases of campylobacteriosis more frequently than with strains of other origins. We have used an easy molecular marker, the RFLP-PCR of *flaA* as initial tool in the search of common clonal groups within the *Campylobacter coli* isolates of both origins. Despite the variability of this marker among the human isolates (51 *flaA* types for 332 *C. coli* isolates from the period 2002-2007), we found a profile (*flaA* type 36) in *C. coli* from broiler rearing farms (birds and environment) also present with relatively high prevalence in clinical origin *C. coli* strains (13.55% in the period 2002-2007). The analysis of the *flaA* type 36 strains (45 from human origin plus nine from chicken origin) was carried out through their resistance profiles, as well as with Short Variable Region of *flaA* gene (SVR-*flaA*), Pulsed Field Gel Electrophoresis with *SmaI* and *BamHI* enzymes (PFGE-*SmaI* and PFGE-*BamHI*), and Multi Locus Sequence Typing (MLST). We found a clonal group of 41 strains comprising the *C. coli* strains of avian origin and spread throughout Spain. Although there were variations in the resistotypes, high tetracycline resistance rate was found. The clonal group of *C. coli* could be defined by *flaA* type 36-ST827-*flaA* peptide 1 and a common band profile in the PFGE analysis.

Keywords: *Campylobacter coli*, MLST, PFGE, *flaA* gene, Clonality, tetracycline resistance, ciprofloxacin resistance.

Introduction

Gastrointestinal illness due to *Campylobacter* spp. is a leading cause of bacterial intestinal disease in the developed world (Levesque et al., 2013) , even considering that data of infection are underestimated (Toljander et al., 2012). *Campylobacter coli* is the second species in number of cases of campylobacteriosis (up to 5 %), but it is generally more resistant to antimicrobials than *C. jejuni* (de Jong et al., 2012). This characteristic makes this species an increasing agent of concern in public health. Although swine is the main host for *C. coli* (Horrocks et al., 2009), strains from this origin seems to form a homogeneous group not related with human cases (Lang et al., 2010). On the contrary, chicken *C. coli* strains are genetically related with strains from clinical cases of campylobacteriosis (Wilson et al., 2008).

Different studies have shown more genomic stability in *C. coli* strains than in *C. jejuni*, evidenced by the association with animal hosts (D'Lima C et al., 2007; Miller et al., 2006; Siemer et al., 2005), therefore the population and epidemiological studies in this species seem easier than in *C. jejuni*.

All studies attempting to establish relationships between strains or to compare strains from different origins require the use of genotypic methods. There are several genotyping methods described for epidemiological studies of *Campylobacter* spp. The PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of the *flaA* gene (RFLP-PCR-*flaA*) has been shown to be very useful, relatively quick, and easy to perform; however, it requires the support of other methods to correctly define the relationships between strains (Miller et al., 2010). Sequencing of the short variable region of the *flaA* gene (SVR-*flaA*) possesses more discriminatory power than RFLP-PCR-*flaA* (Pittenger Levesque et al., 2009) and also has the advantage of an easy and unambiguous comparison between laboratories by a public database (<http://pubmlst.org/campylobacter/>).

Genomic DNA macrorestriction analysis by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) is a highly reproducible and discriminatory typing method for a wide range of bacterial pathogens including *Campylobacter* spp. (Cornelius et al., 2010; Lukinmaa et al., 2004). It is considered that, due to the genomic instability of *Campylobacter* spp., it is not very useful for long-term epidemiological studies (Behringer et al., 2011) . Finally, Multi Locus Sequence Typing (MLST) is a highly reproducible technique based on the differences in the sequence seven “housekeeping” genes, without the ambiguous interpretation of band profiles (Sheppard et al., 2010).

Our aim was to search common clonal groups within the avian and human strains of *C. coli* collected in our laboratory from 2002 to 2007. The search was started though an easy molecular marker such as the RFLP-PCR of *flaA* to select groups of strains. The population structure of the selected strains was characterized using different typing methods (*flaA*-SVR, MLST, PFGE and resistotype) in the search of common clonal groups of both origins

Material and methods

Campylobacter spp. isolates origin

From 2002 to 2007, 1597 *Campylobacter* spp. isolates from 16 hospitals from patients were received in our laboratory. Routinely, a *C. jejuni*/*C. coli* isolate is species-identified by a multiplex PCR (Persson and Olsen, 2005). Although the source of the infection was unknown, we did not select those isolates from outbreaks, to avoid overrepresentation of certain genotypes. Therefore, theoretically, there was no epidemiological relationship among the human isolates.

Antimicrobial susceptibility tests. Resistotypes

The E-test method was selected to investigate the susceptibility of the *Campylobacter* spp. isolates against seven antimicrobials: Ciprofloxacin (CIP), erythromycin (ERY), gentamicin (GEN), amoxicillin (AMX), amoxicillin plus clavulanic acid (AMC), chloramphenicol (CHL) and tetracycline (TCY) (WHONET codification) (Stelling and O'Brien, 1997). All the E-test strips were purchased from Biomérieux Spain. The method was carried out following the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recommendations: that is, the density of bacterial suspension, time and conditions of incubation, and quality control strain *C. jejuni* ATCC 33560 at each batch of tests, among others (CLSI 2010).

The Mueller–Hinton agar supplemented with 5% of defibrinated sheep blood (Becton & Dickinson) was used as the culture medium in all the susceptibility tests.

Available cut-off breakpoints from CLSI are published only for ciprofloxacin, erythromycin and tetracycline, and the rest of antimicrobial cut-off breakpoints were selected from EUCAST "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing" (available in http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ last access 04.02.2014). The combination of resistances defined a resistotype (e.g. resistance only to tetracycline was defined by TCY^R, resistance to ciprofloxacin and amoxicillin as CIP^RAMX^R).

PCRs and DNA sequencing

DNA templates of all the strains examined in the study were obtained using InstaGene Matrix (BioRad Spain, Madrid, Spain) following the instructions of the manufacturer. All the PCR amplifications in this study were performed using the Ready-to-Go system (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK). When necessary, PCR products were purified using the GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences, UK) following the manufacturer's instructions. Sequencing reaction was carried out with a commercial kit (Big Dye Ready Reaction Mix version 3.1, Applied Biosystems, USA) according to the manufacturer's instructions.

RFLP-PCR-*flaA* was carried out following the method and conditions previously published (Nachamkin et al., 1993). For MLST technique we used the primers and the PCR program available on the website: <http://pubmlst.org/campylobacter/info/primers.shtml> to amplify fragments of seven housekeeping genes selected for *C. jejuni* / *C. coli*: *aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt*, *uncA*.

Analysis of SVR-*flaA* sequences

Flagellin A Short Variable Region (SVR) analysis was performed using *flaA* gene amplicons previously obtained. The purified DNA was sequenced using two primers. The first one was the original forward primer used in the amplification of the *flaA* gene (Nachamkin et al., 1993). The reverse primer was a new designed primer, *flaA3R* (5'-GCATTTTATTGATCTCAT-3', from nucleotides 674 to 656 in the published sequence of the *flaA* gene of *C. jejuni* ATCC 29428), designed by us for this analysis. The selected sequences of 321 nucleotides of SVR-*flaA* (nucleotide positions from 186 to 506) were queried in the public database of SVR-*flaA* alleles (<http://pubmlst.org/campylobacter/>). The *flaA* sequences were assigned to allelic designations based on previous sequence submissions to the SVR-*flaA* database.

*Sma*I and *Bam*HI macrorestriction analysis by PFGE

Genomic DNA was prepared following published protocols recommended by PulseNet. The *Sma*I (FastDigest *Sma*I enzyme, Fermentas, Madrid, Spain) digested fragments were separated with the electrophoresis conditions previously described (Ribot et al., 2001). *Bam*HI (FastDigest *Bam*HI enzyme, Fermentas, Madrid, Spain) digested DNA genomic fragments were separated in 1% SeakemGold agarose (Lonza Ibérica S.A., Barcelona, Spain) using the following ramping parameters: 1 – 10 secs 8 hours, and 6.7 – 39 secs 8 hours.

Computer-assisted analysis of banding patterns (RFLP-PCR-*flaA* and PFGE)

The analysis of the RFLP-PCR-*flaA* and PFGE banding patterns (*flaA* types and PFGE types) was performed using the InfoQuest FP software (Bio-Rad). When two *FlaA* types or two PFGE types differed in a single band, we considered them as different. A global comparison using an average estimation from the two PFGE experiments (*SmaI* and *BamHI*) was performed using the InfoQuest FP software. The dendrogram was constructed using the UPGMA method.

Multi Locus Sequence Typing

MLST sequences for each of the seven housekeeping genes were queried against the *Campylobacter jejuni* / *Campylobacter coli* MLST database (<http://pubmlst.org/campylobacter/>) for assignment of allele numbers. Novel sequences were entered into the MLST database where they were assigned new allele numbers. Sequence Types (STs) were also assigned according to the MLST database.

Minimum Spanning Tree

A Minimum Spanning Tree (MST) was constructed with data from MLST and SVR-*flaA* alleles. The sequences of the seven alleles from MLST typing method (*aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt*, *uncA*) plus the SVR of *flaA* gene were combined in a single composite sequence of 3549 bp. The analysis of the composite sequences was performed using the InfoQuest FP software (Bio-Rad). MST was constructed using a simple matching coefficient and Binary coefficient. In the MST representation, the complexes were shaded based on a maximum neighbour distance of one change and minimum size of two types.

Results

Selection of isolates of chicken and human origin sharing a common *flaA* type

Along the 6 years of study (2002-2007), 1597 *Campylobacter* spp. isolates (1265 *C. jejuni*, 332 *C. coli*) from human cases of campylobacteriosis were *flaA* typed in our laboratory. Ninety-five different *flaA* types were described among the *C. jejuni* isolates and 51 among the *C. coli* ones. The diversity of *flaA* profiles by species and year of study is shown in Table 1. With regard the chicken isolates, two initial stages of broiler production were investigated (29 flocks from the two stages) taking cloacal swabs and environmental samples. A total number of 190 *C. coli* strains were identified from chicken origin. The comparison of the *flaA* types amongst both origins revealed the presence of a common *flaA* type (*flaA* type 36, in our laboratory code) in 46 isolates (45

C. coli and 1 *C. jejuni*), from eight different Spanish Hospitals (H1-H8) and from the chicken isolates of two flocks. Nine *flaA* type 36 isolates of avian origin were chosen (*C. coli* and one *C. jejuni*), two from environmental samples (drinking water) and seven from poultry cloacal swabs, each one with slightly different PFGE profiles. Thus, a final number of 54 isolates were chosen for the populational study. The average prevalence of *flaA* type 36 among the *C. coli* isolates from human origin between 2002 and 2007 was 13.55%.

***Sma*I and *Bam*HI macrorestriction analysis**

The combination of the two profiles generated with each restriction enzyme (*Sma*I and *Bam*HI) was analyzed. We selected a cut-off value of 85% to group the isolates, which generated one cluster (Cluster 1) composed by 41 isolates in which all the *C. coli* isolates from poultry could be found (figure 1).

Resistotypes

Among the cluster 1, generated through the PFGE analysis (41 isolates from human and chicken origin), six different resistotypes were described. Resistotypes TCY^R and CIP^RTCY^R were the most prevalent with 17 isolates each one. Only two isolates could be considered as pansusceptible. Taking all the isolates of the study, it is remarkably the tetracycline resistance, with an 87% of resistance (47 out of 54 isolates). Ciprofloxacin resistance is also of concern with a 61.1% of resistance (33 out of 54 isolates).

SVR-*flaA* analysis

Through the sequence of SVR fragment of *flaA* gene from all the *flaA* type 36 isolates in the study, 10 different alleles were found: 28, 236, 244, 255, 271, 493, 589, 603, 604, and 1430 (the last four alleles were described for the first time by this study). The majority of the isolates in the study (34 isolates) possessed the allele 255. All the described alleles generated two different peptides according to SVR database: P1 and P10.

When sequences of P1 and P10 amino acids were compared, only one difference was found: P1 possessed a Serine in position 88 as opposed to Threonine in P10 (data not shown). As seen in the figure 1, the isolates grouped in the cluster 1 (isolates of human and chicken origin) possessed exclusively the peptide 1. The rest of isolates possessed the peptide 10, with the exception of the only *C. jejuni* isolate in the study (P1).

MLST analysis:

The list of the STs obtained in the study is shown in the Table 1. Multi Locus Sequence Typing (MLST) analysis discriminated isolates between nine STs (Sequence Types): 48, 50, 827, 828, 1173, 1582, 1687, 1689, and 1750. Most of the isolates were included within ST827 (41 isolates) and ST1750 (five isolates). All but one isolate within the cluster 1 (isolate 05H3-IS01, ST1173) belonged to ST827. This Sequence Type differs from ST827 in one allele, *pgm*.

Minimum spanning tree (MST)

In order to compare the results of PFGE with those derived from sequencing of MLST and SVR-*flaA*, we combined the sequences of the seven MLST alleles plus the SVR-*flaA* sequence for each isolate, which led to a single sequence of 3549 nucleotides. The composite sequences of all the isolates were compared using Infoquest Software with a Minimum Spanning Tree analysis. As seen in Figure 2, there was a shadowed group composed of isolates with a maximum of one change in their composite sequences. This group composed by 35 isolates included all the chicken isolates. The *C. jejuni* isolate from the study appeared located with a distance of 442 changes in the sequence with regard the *C. coli* isolates.

Discussion

The genetic instability frequently reported among *Campylobacter jejuni* strains (Ridley et al., 2008; Scott et al., 2007) increases the difficulty of evaluating this microorganism in population and epidemiological studies. On the contrary, other studies attribute more genomic stability for the closely related species *C. coli* (Duim et al., 1999; Miller et al., 2006). This is reflected in the association of certain *C. coli* clones to a single type of host, in example, cattle or turkey (Miller et al., 2006; Schouls et al., 2003; Sheppard et al., 2010).

The genotypic marker RFLP-PCR-*flaA* has been widely used in epidemiological surveys in *Campylobacter* spp. (Nakari et al., 2005; Petersen and On, 2000), but it has always been criticized because of its variability (Mellmann et al., 2004). This variability is reflected in our study, where 51 and 95 different restriction patterns (*flaA* types) were described among human *C. coli* and *C. jejuni* isolates, respectively. On the other hand, we detected one *flaA* type (*flaA* type 36) shared within the *C. coli* isolates of chicken origin and human origin. This *flaA* type was present with relatively high prevalence among the *C. coli* isolates of human origin (13.55 % from 2002 to 2007).

With the objective to further characterize the group of *flaA* type 36 isolates (46 isolates of human origin plus nine isolates from chicken) we carried out different molecular markers: PFGE, SVR-*flaA* allele, and MLST; thus, we could compare the isolates sharing the same *flaA* type. Moreover, the resistance phenotype (resistotype) of the isolates was also compared.

It is widely accepted that two restriction enzymes are necessary for a correct interpretation of data derived from PFGE in *Campylobacter* (Cornelius et al., 2010). With the analysis of PFGE using *Sma*I and *Bam*HI, and a cut-off value of 85% of similarity, a cluster of 41 isolates including all chicken isolates was detected.

Previous studies have shown that SVR fragment of *flaA* gene is extremely variable (Dingle et al., 2005). In our study, one single *flaA* type could harbour up to ten different alleles; on the other hand, only two closely similar *flaA* peptides were generated by these alleles: P1 and P10. Cluster 1, generated through the analysis of PFGE profiles contained all the chicken isolates, and all those isolates possessed the peptide 1, finding variability in the rest of isolates.

The MLST typing showed slightly variations of the STs, thus, all but one isolate from cluster 1 were identified as ST827, which belongs to clonal complex ST-828, which is the most numerous in *C. coli*.

In the study, two *flaA* type 36 isolates were identified as *C. jejuni*, being the only molecular marker shared with the *C. coli* isolates from the study. One of the isolates was of human origin, and the other from chicken, sharing the farm with the *C. coli* of chicken origin. Although not proved, this might reflect the acquisition of the *flaA* gene from a *C. coli* isolate. In fact, allelic acquisition of *C. jejuni* alleles by *C. coli* has been reported previously (Sheppard et al., 2008).

With the objective of comparison of results from PFGE and those derived from sequencing (MLST alleles plus the SVR-*flaA*), a minimum spanning tree was performed with the sequences of the isolates from the study. As equal as in the PFGE analysis, all the chicken isolates clustered together with most of the human isolates in a group of 35 isolates. The cluster generated was smaller than the cluster 1 from PFGE due to the polymorphisms present in SVR alleles of *flaA*.

With regard the resistotypes, more variability was observed. In the Cluster 1 generated by PFGE analysis, up to five different resistotypes were described, but all but two were resistant against tetracycline, alone or combined with other resistances. It is also remarkable the high percentage of ciprofloxacin resistance among all the isolates in the

study, reflecting a true concern for Public health. Variations in resistotype might indicate different antibiotic pressure in each of the isolates along the time. As other authors have shown, tetracycline resistance has been linked to *C. coli* due to the use of tetracycline and derivatives in swine production (Luangtongkum et al., 2009; Moore et al. 2006).

With the data available from our study we cannot conclude that chicken is the animal reservoir of the described clonal line. We would need samples from other potential reservoirs of *C. coli*, especially swine, which is the main reservoir of this species (Horrocks et al., 2009). However, the isolates of swine origin seems to form a homogeneous group of strains while human and chicken *C. coli* strains possess considerable genetic overlapping (Lang et al., 2010). In fact, several authors have shown that most of the *C. coli* campylobacteriosis are associated with chicken consumption (Sheppard et al., 2009; Wilson et al., 2008). Moreover, Sopwith et al (Sopwith et al., 2010) found that ST827 was the most prevalent ST in the *C. coli* isolated from human cases of campylobacteriosis.

In conclusion, while *Campylobacter* spp. is presented as a weak clonal microorganism, we were able to find a closely related group of isolates of human and chicken origin by different genotypic markers. This clonal group, defined by *flaA* type 36-ST827-FlaA peptide1 is disseminated in Spain. High prevalence of ciprofloxacin and tetracycline resistance was found among the isolates of the study. The study contributes to a better understanding of the population structure of the pathogen *C. coli* and shows the utility of *flaA* marker in populational studies as an initial tool of investigation. Further studies would be needed to determine whether this chicken and human clonal group of *C. coli* are restricted to Spain or whether they are also isolated in other European countries.

Acknowledgments

This survey was funded as part of project MPY-1179/02 by the “Instituto de Salud Carlos III” (Spain). This publication made use of the Campylobacter Multi Locus Sequence Typing website (<http://pubmlst.org/campylobacter/>) developed by Keith Jolley and Man-Suen Chan (Jolley et al. 2004, *BMC Bioinformatics*, 5:86) and located at the University of Oxford. Initial development of this site was funded by the Wellcome Trust and maintenance is funded by DEFRA.

318 Table 1. Data from the *Campylobacter* spp. isolates of human and food origin,
 319 depicting the number of *flaA* typified isolates. The diversity of *flaA* profiles by year and
 320 the prevalence of F36 among *C. coli* isolates along the study are also reflected.

321
 322
 323
 324

Year	Number of Isolates <i>flaA</i> typified		Nº Different <i>C. jejuni</i> <i>flaA</i> profiles	Nº Different <i>C. coli</i> <i>flaA</i> profiles	Prevalence of F36 among <i>C. coli</i> isolates (%)
	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>			
2002	213	53	41	13	11.3
2003	115	28	37	13	32.1
2004	277	74	57	25	1.3
2005	198	47	52	22	17
2006	257	86	49	6	12.7
2007	205	44	43	17	25
Total	1265	332	95‡	51‡	13.55*

325
 326
 327
 328
 329

330 ‡ Number of different *flaA* profiles from 2002 to 2007
 331 * Average prevalence of F36 along the survey (2002-2007)

332
 333
 334

N° Isolate	Year	Source	<i>flaA</i> - SVR		Allele nucleotide sequence number								Resistotype	PFGE Cluster
			Allele	Peptide	ST	<i>aspA</i>	<i>glnA</i>	<i>gltA</i>	<i>glyA</i>	<i>pgm</i>	<i>tkl</i>	<i>uncA</i>		
20020100	2002	H2	255	1	827	33	39	30	82	104	56	17	CIP ^R AMX ^R TCY ^R	CL1
20020109	2002	H1	255	1	827	33	39	30	82	104	56	17	TCY ^R	CL1
20020229	2002	H3	603	10	828	33	39	30	82	104	43	17	CIP ^R AMX ^R	-
20020340	2002	H2	255	1	827	33	39	30	82	104	56	17	CIP ^R TCY ^R	CL1
20020342	2002	H2	255	1	827	33	39	30	82	104	56	17	CIP ^R TCY ^R	CL1
20020348	2002	H2	255	1	827	33	39	30	82	104	56	17	CIP ^R TCY ^R	CL1
20030059	2003	H1	28	10	1750	33	39	30	115	113	43	17	CIP ^R TCY ^R	-
20030162	2003	H1	255	1	827	33	39	30	82	104	56	17	CIP ^R TCY ^R	CL1
20030289	2003	H1	255	1	827	33	39	30	82	104	56	17	TCY ^R	CL1
20030321	2003	H1	255	1	827	33	39	30	82	104	56	17	CIP ^R TCY ^R	CL1
20030481	2003	H1	28	10	827	33	39	30	82	104	56	17	CIP ^R	-
20030501	2003	H1	28	10	1750	33	39	30	115	113	43	17	CIP ^R AMX ^R TCY ^R	-
20030504	2003	H1	589	1	827	33	39	30	82	104	56	17	CIP ^R TCY ^R	CL1
20030517	2003	G1	255	1	827	33	39	30	82	104	56	17	TCY ^R	CL1
20030525	2003	G1	255	1	827	33	39	30	82	104	56	17	TCY ^R	CL1
20030587	2003	H1	589	1	827	33	39	30	82	104	56	17	CIP ^R TCY ^R CHL ^R	CL1
20030602	2003	W1	255	1	827	33	39	30	82	104	56	17	TCY ^R	CL1
20030607	2003	W2	255	1	827	33	39	30	82	104	56	17	TCY ^R	CL1
20030618	2003	G2	255	1	827	33	39	30	82	104	56	17	TCY ^R	CL1
20030620	2003	G2	255	1	827	33	39	30	82	104	56	17	TCY ^R	CL1

20030662	2003	H1	255	1	827	33	39	30	82	104	56	17	CIP ^R	CL1
20030723	2003	G2	255	1	827	33	39	30	82	104	56	17	TCY ^R	CL1
20030731	2003	G2	255	1	827	33	39	30	82	104	56	17	TCY ^R	CL1
20030984	2003	G2	255	1	50	2	1	12	3	2	1	5	PanS	-
20040443	2004	H1	255	1	827	33	39	30	82	104	56	17	TCY ^R	CL1
20050113	2005	H1	236	1	827	33	39	30	82	104	56	17	CIP ^R TCY ^R	CL1
20050410	2005	H3	604	1	1173	33	39	30	82	113	56	17	CIP ^R TCY ^R	CL1
20050411	2005	H1	255	1	827	33	39	30	82	104	56	17	TCY ^R	CL1
20050475	2005	H4	255	1	827	33	39	30	82	104	56	17	TCY ^R	CL1
20050500	2005	H1	493	10	1687	33	195	65	82	113	242	17	CIP ^R TCY ^R	-
20050653	2005	H3	28	10	1750	33	39	30	115	113	43	17	CIP ^R AMX ^R TCY ^R	-
20060107	2006	H5	28	10	1750	33	39	30	115	113	43	17	CIP ^R TCY ^R	-
20060152	2006	H4	28	10	1750	33	39	30	115	113	43	17	CIP ^R AMX ^R TCY ^R	-
20060197	2006	H5	255	1	827	33	39	30	82	104	56	17	CIP ^R TCY ^R	CL1
20060286	2006	H6	255	1	827	33	39	30	82	104	56	17	CIP ^R TCY ^R	CL1
20060378	2006	H5	255	1	827	33	39	30	82	104	56	17	CIP ^R TCY ^R	CL1
20060515	2006	H6	255	1	827	33	39	30	82	104	56	17	CIP ^R TCY ^R	CL1
20060623	2006	H4	255	1	827	33	39	30	82	104	56	17	TCY ^R	CL1
20060648	2006	H6	255	1	827	33	39	30	82	104	56	17	CIP ^R TCY ^R	CL1
20060665	2006	H4	244	1	48	2	4	1	2	7	1	5	CIP ^R	-
20060691	2006	H8	589	1	827	33	39	30	82	104	56	17	TCY ^R	CL1
20060732	2006	H4	255	1	827	33	39	30	82	104	56	17	PanS	CL1

20060843	2006	H7	271	10	1689	33	176	30	82	113	242	17	CIP ^R TCY ^R	-
20070029	2007	H3	255	1	827	33	39	30	82	104	56	17	PanS	CL1
20070040	2007	H3	255	1	827	33	39	30	82	104	56	17	CIP ^R TCY ^R	CL1
20070050	2007	H4	28	10	828	33	39	30	82	104	43	17	PanS	-
20070144	2007	H3	255	1	827	33	39	30	82	104	56	17	CIP ^R TCY ^R	CL1
20070151	2007	H3	236	1	827	33	39	30	82	104	56	17	TCY ^R	CL1
20070152	2007	H3	236	1	827	33	39	30	82	104	56	17	TCY ^R	CL1
20070153	2007	H3	255	1	827	33	39	30	82	104	56	17	CIP ^R	CL1
20070211	2007	H3	28	10	1582	33	39	30	79	113	47	41	CIP ^R TCY ^R	-
20070304	2007	H3	1430	1	827	33	39	30	82	104	56	17	CIP ^R TCY ^R	CL1
20070352	2007	H3	255	1	827	33	39	30	82	104	56	17	CIP ^R AMX ^R TCY ^R	CL1
20070455	2007	H3	255	1	827	33	39	30	82	104	56	17	CIP ^R TCY ^R	CL1

335

336 Table 2. Data obtained from molecular markers and susceptibility tests in the study for
337 all the isolates. H1-H8: Hospitals 1-8. G1: Rearing Farm 1, G2: Rearing Farm 2. W1:
338 Drinking Water from Rearing Farm 1, W2: Drinking Water from Rearing Farm 2. CL1:
339 Cluster 1 generated from PFGE analysis.

340

341

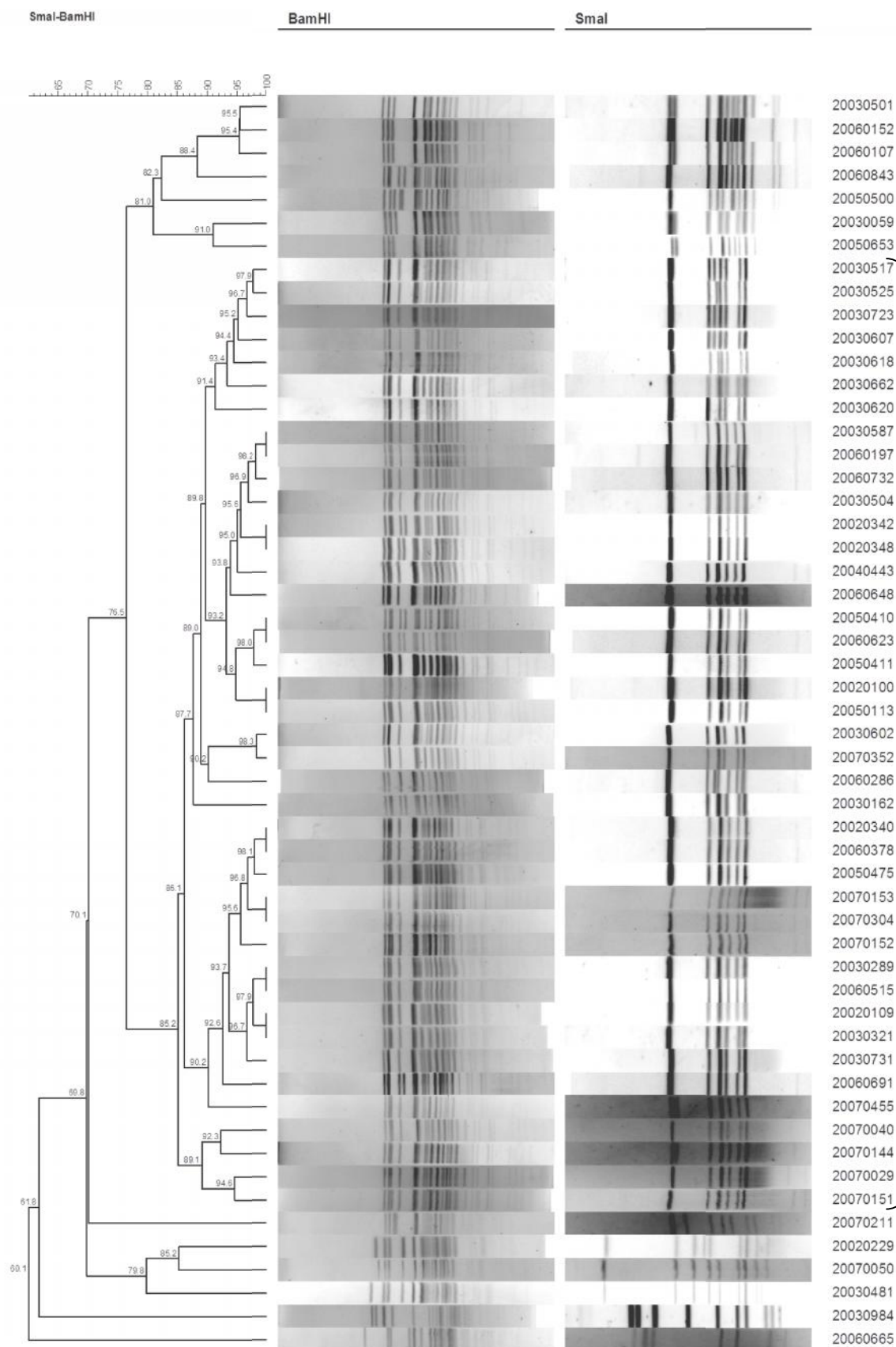


Figure 1

343 *C. coli* isolates

C. jejuni isolates

344

345

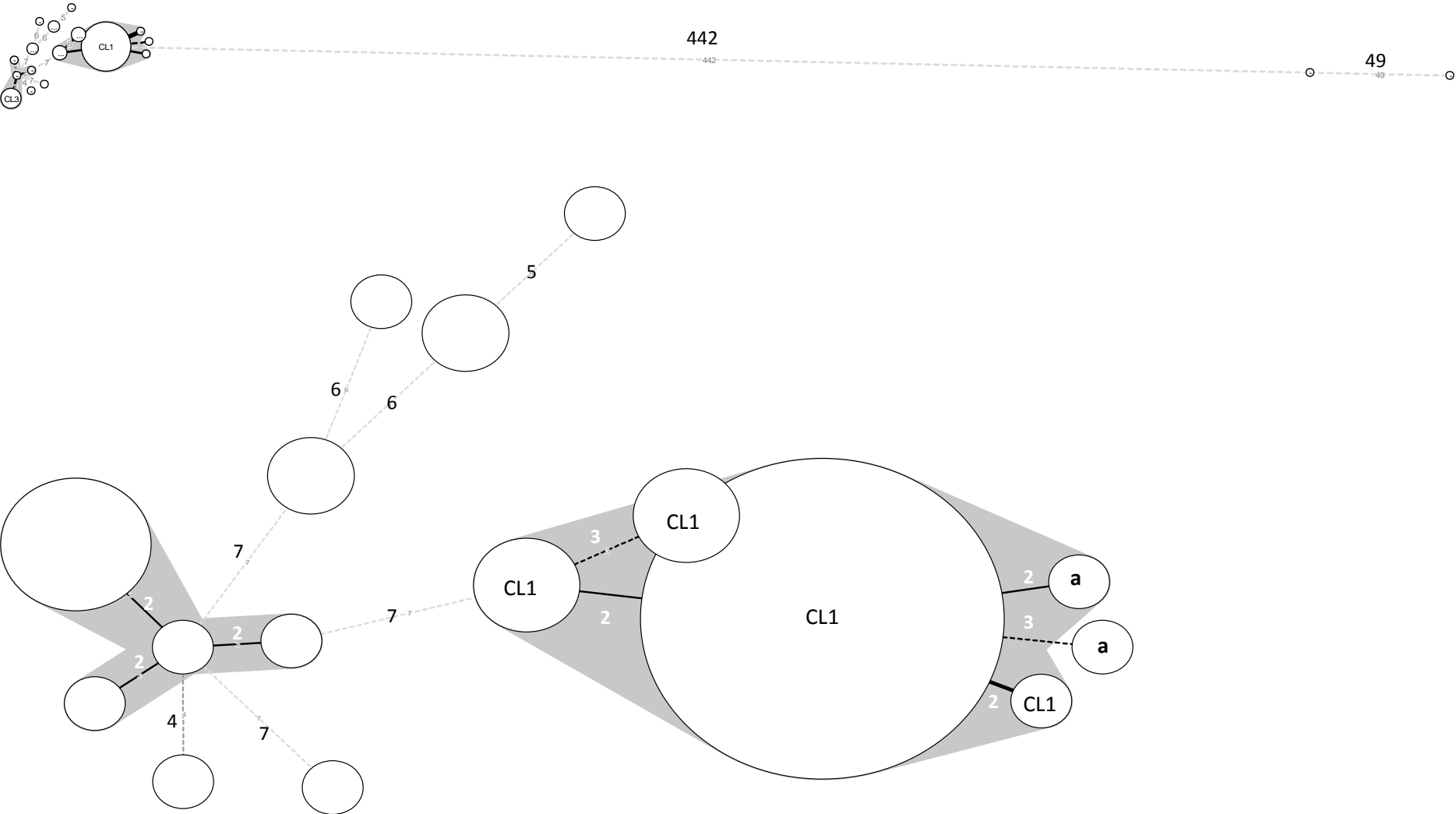


Figure 2

347

Figure Legends:

Figure 1: Dendrogram obtained from the *Bam*HI and *Sma*I PFGE profiles of the 54 *Campylobacter* spp. isolates selected in the study sharing the same RFLP-PCR *flaA* genotype. An 85% of similarity has been selected as cut-off value to consider an isolate as belonging to a cluster. One main cluster (Cluster 1) composed by 41 isolates, including all the *C. coli* isolates of chicken origin is shown.

Figure 2: Minimum spanning tree (MST) based on the analysis of MLST alleles plus SVR-*flaA* sequence. MST is constructed with categorical coefficient and it is shown with logarithmic branch lengths; complexes of closely related isolates are shaded based on a maximum neighbor distance of two changes and minimum size of two types. Numbers on the lines connecting clusters show the number of changes in the sequences. CL1: isolates belonging to Cluster 1 obtained in PFGE. **a**: isolates closely related with those from Cluster 1 by MST but not belonging to it.

References

- Behringer, M., Miller, W.G., Oyarzabal, O.A., 2011, Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from live broilers and retail broiler meat by *flaA*-RFLP, MLST, PFGE and REP-PCR. J Microbiol Methods 84, 194-201.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline-Second Edition. CLSI Document M45-A2 Vol 30 No 18. CLSI, Wayne, PA, USA
- Cornelius, A.J., Gilpin, B., Carter, P., Nicol, C., On, S.L., 2010, Comparison of PCR binary typing (P-BIT), a new approach to epidemiological subtyping of *Campylobacter jejuni*, with serotyping, pulsed-field gel electrophoresis, and multilocus sequence typing methods. Appl Environ Microbiol 76, 1533-1544.
- D'Lima C, B., Miller, W.G., Mandrell, R.E., Wright, S.L., Siletzky, R.M., Carver, D.K., Kathariou, S., 2007, Clonal population structure and specific genotypes of multidrug-resistant *Campylobacter coli* from Turkeys. Appl Environ Microbiol 73, 2156-2164.
- de Jong, A., Thomas, V., Simjee, S., Godinho, K., Schiessl, B., Klein, U., Butty, P., Valle, M., Marion, H., Shryock, T.R., 2012, Pan-European monitoring of susceptibility to human-use antimicrobial agents in enteric bacteria isolated from healthy food-producing animals. J Antimicrob Chemother 67, 638-651.
- Dingle, K.E., Colles, F.M., Falush, D., Maiden, M.C., 2005, Sequence typing and comparison of population biology of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. J Clin Microbiol 43, 340-347.
- Duim, B., Wassenaar, T.M., Rigter, A., Wagenaar, J., 1999, High-resolution genotyping of *Campylobacter* strains isolated from poultry and humans with amplified fragment length polymorphism fingerprinting. Appl Environ Microbiol 65, 2369-2375.
- Horrocks, S.M., Anderson, R.C., Nisbet, D.J., Ricke, S.C., 2009, Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. Anaerobe 15, 18-25.
- Lang, P., Lefebure, T., Wang, W., Pavinski Bitar, P., Meinersmann, R.J., Kaya, K., Stanhope, M.J., 2010, Expanded multilocus sequence typing and comparative genomic hybridization of *Campylobacter coli* isolates from multiple hosts. Appl Environ Microbiol 76, 1913-1925.

402 Levesque, S., Fournier, E., Carrier, N., Frost, E., Arbeit, R.D., Michaud, S., 2013,
 403 Campylobacteriosis in urban versus rural areas: a case-case study integrated with
 404 molecular typing to validate risk factors and to attribute sources of infection. PLoS One
 405 8, e83731.

406 Luangtongkum, T., Jeon, B., Han, J., Plummer, P., Logue, C.M., Zhang, Q., 2009, Antibiotic
 407 resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. Future Microbiol
 408 4, 189-200.

409 Lukinmaa, S., Nakari, U.M., Eklund, M., Siitonen, A., 2004, Application of molecular genetic
 410 methods in diagnostics and epidemiology of food-borne bacterial pathogens. APMIS
 411 112, 908-929.

412 Mellmann, A., Mosters, J., Bartelt, E., Roggentin, P., Ammon, A., Friedrich, A.W., Karch, H.,
 413 Harmsen, D., 2004, Sequence-based typing of *flaB* is a more stable screening tool than
 414 typing of *flaA* for monitoring of *Campylobacter* populations. J Clin Microbiol 42, 4840-
 415 4842.

416 Miller, R.S., Miller, W.G., Behringer, M., Hariharan, H., Matthew, V., Oyarzabal, O.A., 2010, DNA
 417 identification and characterization of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*
 418 isolated from caecal samples of chickens in Grenada. J Appl Microbiol 108, 1041-1049.

419 Miller, W.G., Englen, M.D., Kathariou, S., Wesley, I.V., Wang, G., Pittenger-Alley, L., Siletz, R.M.,
 420 Muraoka, W., Fedorka-Cray, P.J., Mandrell, R.E., 2006, Identification of host-associated
 421 alleles by multilocus sequence typing of *Campylobacter coli* strains from food animals.
 422 Microbiology 152, 245-255.

423 Moore, J.E., Barton, M.D., Blair, I.S., Corcoran, D., Dooley, J.S., Fanning, S., Kempf, I., Lastovica,
 424 A.J., Lowery, C.J., Matsuda, M., McDowell, D.A., McMahon, A., Millar, B.C., Rao, J.R.,
 425 Rooney, P.J., Seal, B.S., Snelling, W.J., Tolba, O., 2006, The epidemiology of antibiotic
 426 resistance in *Campylobacter*. Microbes Infect 8, 1955-1966.

427 Nachamkin, I., Bohachick, K., Patton, C.M., 1993, Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by
 428 restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol 31, 1531-1536.

429 Nakari, U.M., Laaksonen, K., Korkeila, M., Siitonen, A., 2005, Comparative typing of
 430 *Campylobacter jejuni* by heat-stable serotyping and PCR-based restriction fragment
 431 length polymorphism analysis. J Clin Microbiol 43, 1166-1170.

432 Persson, S., Olsen, K.E., 2005, Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and
 433 *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. J Med Microbiol
 434 54, 1043-1047.

435 Petersen, L., On, S.L., 2000, Efficacy of flagellin gene typing for epidemiological studies of
 436 *Campylobacter jejuni* in poultry estimated by comparison with macrorestriction
 437 profiling. Lett Appl Microbiol 31, 14-19.

438 Pittenger, L.G., Englen, M.D., Parker, C.T., Frye, J.G., Quinones, B., Horn, S.T., Son, I., Fedorka-
 439 Cray, P.J., Harrison, M.A., 2009, Genotyping *Campylobacter jejuni* by comparative
 440 genome indexing: an evaluation with pulsed-field gel electrophoresis and *flaA* SVR
 441 sequencing. Foodborne Pathog Dis 6, 337-349.

442 Ribot, E.M., Fitzgerald, C., Kubota, K., Swaminathan, B., Barrett, T.J., 2001, Rapid pulsed-field gel
 443 electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. J Clin Microbiol 39,
 444 1889-1894.

445 Ridley, A.M., Toszeghy, M.J., Cawthraw, S.A., Wassenaar, T.M., Newell, D.G., 2008, Genetic
 446 instability is associated with changes in the colonization potential of *Campylobacter*
 447 *jejuni* in the avian intestine. J Appl Microbiol 105, 95-104.

448 Scott, A.E., Timms, A.R., Connerton, P.L., Loc Carrillo, C., Adzfa Radzum, K., Connerton, I.F., 2007,
 449 Genome dynamics of *Campylobacter jejuni* in response to bacteriophage predation. PLoS
 450 Pathog 3, e119.

451 Schouls, L.M., Reulen, S., Duim, B., Wagenaar, J.A., Willems, R.J., Dingle, K.E., Colles, F.M., Van
 452 Embden, J.D., 2003, Comparative genotyping of *Campylobacter jejuni* by amplified
 453 fragment length polymorphism, multilocus sequence typing, and short repeat
 454 sequencing: strain diversity, host range, and recombination. J Clin Microbiol 41, 15-26.

455 Sheppard, S.K., Dallas, J.F., Strachan, N.J., MacRae, M., McCarthy, N.D., Wilson, D.J., Gormley,
 456 F.J., Falush, D., Ogden, I.D., Maiden, M.C., Forbes, K.J., 2009, *Campylobacter* genotyping
 457 to determine the source of human infection. Clin Infect Dis 48, 1072-1078.

458 Sheppard, S.K., Dallas, J.F., Wilson, D.J., Strachan, N.J., McCarthy, N.D., Jolley, K.A., Colles, F.M.,
 459 Rotariu, O., Ogden, I.D., Forbes, K.J., Maiden, M.C., 2010, Evolution of an agriculture-
 460 associated disease causing *Campylobacter coli* clade: evidence from national surveillance
 461 data in Scotland. PLoS One 5, e15708.

462 Sheppard, S.K., McCarthy, N.D., Falush, D., Maiden, M.C., 2008, Convergence of *Campylobacter*
463 species: implications for bacterial evolution. *Science* 320, 237-239.

464 Siemer, B.L., Nielsen, E.M., On, S.L., 2005, Identification and molecular epidemiology of
465 *Campylobacter coli* isolates from human gastroenteritis, food, and animal sources by
466 amplified fragment length polymorphism analysis and Penner serotyping. *Appl Environ*
467 *Microbiol* 71, 1953-1958.

468 Sopwith, W., Birtles, A., Matthews, M., Fox, A., Gee, S., James, S., Kempster, J., Painter, M.,
469 Edwards-Jones, V., Osborn, K., Regan, M., Syed, Q., Bolton, E., 2010, Investigation of
470 food and environmental exposures relating to the epidemiology of *Campylobacter coli* in
471 humans in Northwest England. *Appl Environ Microbiol* 76, 129-135.

472 Stelling, J.M., O'Brien, T.F., 1997, Surveillance of antimicrobial resistance: the WHONET program.
473 *Clin Infect Dis* 24 Suppl 1, S157-168.

474 Toljander, J., Dovarn, A., Andersson, Y., Ivarsson, S., Lindqvist, R., 2012, Public health burden due
475 to infections by verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *Campylobacter* spp.
476 as estimated by cost of illness and different approaches to model disability-adjusted life
477 years. *Scand J Public Health*.

478 Wilson, D.J., Gabriel, E., Leatherbarrow, A.J., Cheesbrough, J., Gee, S., Bolton, E., Fox, A.,
479 Fearnhead, P., Hart, C.A., Diggle, P.J., 2008, Tracing the source of campylobacteriosis.
480 *PLoS Genet* 4, e1000203.

481

482

483

484

CAPÍTULO

II

Capítulo II

Artículo 4

“Antimicrobial Susceptibilities of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Strains Isolated from Two Early Stages of Poultry Production”

“Resistencias antimicrobianas de cepas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* aisladas a partir de dos etapas tempranas en la producción de pollo”

Resumen del artículo:

Objetivos: El objetivo de este estudio fue conocer los valores de resistencia frente a seis familias de antimicrobianos (quinolonas, macrólidos, betalactámicos, aminoglicósidos, fenicoles y tetraciclinas) en las cepas de *Campylobacter jejuni* y *C. coli* aisladas en dos etapas iniciales de producción de *broilers* (*Grandparent Breeder Farms* –GPBF- y *Parent Breeder Farms* –PBF-) en España.

Métodos: Se investigaron 805 cepas (697 *C. jejuni* y 108 *C. coli*) obtenidas de dos etapas iniciales de producción de *broilers* (17 lotes de abuelas y 12 lotes de reproductoras). En todos los casos se escogieron los muestreos en los que había una prevalencia mínima de *Campylobacter* del 30%. Con la localización de las granjas de abuelas y de reproductoras nos aseguramos una buena representación geográfica del país (14 provincias diferentes). La técnica utilizada para investigar la resistencia de las cepas fue la de difusión en disco, realizada de acuerdo a las normas del *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI). Los discos utilizados fueron de los antibióticos: ácido nalidíxico, ciprofloxacino, eritromicina, amoxicilina, amoxicilina más ácido clavulánico, gentamicina, cloranfenicol y tetraciclina. Los valores de corte para decidir si una cepa era sensible o resistente fueron los del *Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie*. Una selección de cepas fue repetida para comprobar los valores obtenidos.

Resultados: Considerando las dos etapas de producción de forma conjunta, los valores de resistencia más altos encontrados en el estudio fueron frente a las quinolonas (74.9% ácido nalidíxico y 73.9% ciprofloxacino, los porcentajes no son equivalentes por la presencia de una pequeña población de cepas resistentes solo a ácido nalidíxico), seguido de un 48.2 % de

resistentes a tetraciclina y un 3.1% a eritromicina. Se encontró un 14.4% de multiresistentes y un 10.3% de cepas pansusceptibles, no hubo ninguna cepa en el estudio resistente a gentamicina, amoxicilina más ácido clavulánico o cloranfenicol. En cuanto a los datos por etapa de producción, las diferencias en los porcentajes de resistencia son estadísticamente significativos en todos los antibióticos testados, así, por ejemplo, la resistencia a tetraciclina es prácticamente doble en PBFs que en GPBFs (73.7% vs. 39.9%), respectivamente, o el porcentaje de multiresistentes es casi seis veces mayor en PBFs que en GPBFs (38.4 % vs. 6.6%). En cuanto a las diferencias por especie aislada, *C. coli* tuvo mayor porcentaje de resistencia que *C. jejuni* frente a tetraciclina (96.3% vs. 40.7%), y eritromicina (solo se detectó resistencia a este macrólido en una población de *C. coli* de una PBF), así como un mayor porcentaje de multiresistencia. Por el contrario, para las quinolonas, el porcentaje de resistentes fue superior en *C. jejuni*. En cuanto a las diferencias por especie y etapa de producción, los datos son similares, destacando en PBF una diferencia significativa para la resistencia a amoxicilina (52.4% *C. jejuni* vs. 20.3% *C. coli*) y un porcentaje similar y muy elevado de resistencia a ciprofloxacino (80.6 *C. jejuni* vs. 87.8% *C. coli*).

Conclusiones: El valor más elevado de resistencias, frente a quinolonas, ha descendido respecto a otros estudios llevados a cabo en España en años anteriores, pero nos indica que reducir la prevalencia de esta resistencia a valores inferiores al 20% es un objetivo difícil. Es destacable la ausencia de algunas resistencias (gentamicina, cloranfenicol, amoxicilina más ácido clavulánico), así como la presencia de poblaciones pansusceptibles, incluso conviviendo con poblaciones resistentes a otros antibióticos. Existe un porcentaje de multiresistentes a considerar, siendo poblaciones objetivo a erradicar en las granjas. Los porcentajes de resistencia varían según la etapa de producción, apareciendo mayor número de resistencia en general en PBFs, así como multiresistentes. La heterogeneidad de las granjas de esta etapa hace difícil establecer la razón de esas diferencias, aunque la mayor presencia de la especie *C. coli* pudiera tener influencia en los porcentajes globales en esta etapa. Como hemos visto y se apunta en algunos estudios, *Campylobacter coli* posee mayores porcentajes de resistencia a la mayoría de antibióticos, siendo además la única especie donde se encontró resistencia a macrólidos, antibiótico de elección en las campilobacteriosis severas. Diferentes estudios apuntan al uso de macrólidos en la cría de cerdo, animal donde *C. coli* es mayoritario. El porcentaje de resistencia global frente a este antibiótico es bajo, y similar al de otros países de nuestro entorno.

Claves del artículo y relación con los objetivos planteados

En este artículo se abordan aspectos relacionados con el Objetivo 1.1, aun no siendo el principal objetivo del trabajo. Las principales claves del artículo están relacionadas con el Objetivo 2.1. Prevalencia de las resistencias a antimicrobianos en cepas avícolas:

1. De forma conjunta, para las dos etapas de producción, la resistencia frente a quinolonas y fluroroquinolonas fue la mayoritaria (74.9% frente a ácido nalidíxico y un 73.9% frente a ciprofloxacino). Son porcentajes altos, aunque se observa un descenso frente a los datos procedentes de otros estudios realizados hace varios años.
2. De igual modo, con los datos conjuntos de las dos etapas de producción, los porcentajes de resistencia frente al resto de antibióticos fueron similares a los de otros países europeos (tetraciclina 48.2%, amoxicilina 19.8% y eritromicina 3.1%).
3. Diferencias en resistencia para la dos especies aisladas, *C. jejuni* y *C. coli*. La especie *C. coli* posee mayor porcentaje de multirresistentes, de resistencia a tetraciclina y es la única especie en la que se encontró resistencia frente a macrólidos.
4. Diferencias entre las dos etapas de producción. En la etapa GPBF hay menores porcentajes de resistencia y mayor porcentaje de Pansusceptibles. En la etapa PBF hay mayor porcentaje de resistencia a todos los antibióticos testados y mayor número de multiresistentes. Una mayor población de *C. coli* en esta etapa puede influir en los porcentajes finales de resistencia.
5. No se encontró resistencia frente a varios grupos de antibióticos testados: gentamicina, amoxicilina más ácido clavulánico y cloranfenicol.

Antimicrobial Susceptibilities of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Strains Isolated from Two Early Stages of Poultry Production

David Pérez-Boto,¹ Francisco Javier García-Peña,² Juan Carlos Abad-Moreno,³ and M. Aurora Echeita¹

Our aim was to monitor the resistance of *Campylobacter* isolates from two initial stages of broiler production in 5 grandparent breeder broiler farms (GPBFs) and 12 parent breeder broiler farms (PBFs) in which no antimicrobials were used during the study. Susceptibility tests were carried out for 805 strains (697 *Campylobacter jejuni* and 108 *Campylobacter coli*) against nalidixic acid, ciprofloxacin, erythromycin, amoxicillin, amoxicillin plus clavulanic acid, tetracycline, gentamicin, and chloramphenicol using the disk-diffusion method. Quinolone resistance was the most abundant overall (74.9%) and at each stage of production. The second largest resistance was for tetracycline with 48.2%. The resistance against amoxicillin plus clavulanic acid, gentamicin, and chloramphenicol was not found. The percentages of resistance and multidrug-resistant (MDR) isolates were always higher in the PBFs than in the GPBFs. However, pan-susceptible populations (total 10.3%) were isolated in our survey. *C. coli* isolates were more resistant to tetracycline and erythromycin (96.3% and 23.1%, respectively) than for *C. jejuni* (40.7% and 0%, respectively) and were more MDR (33.3% vs. 11.9%). In conclusion, as other authors have shown, even in the absence of antibiotic pressure, relatively high rates of quinolone resistance are found in *Campylobacter*. However, a decrease in quinolone resistance has been observed compared to other studies in Spain [i.e., 99%; Saenz *et al.* Antimicrob. Agents Chemother. 2000;**44**(2):267–271]. MDR, fluoroquinolone-, macrolide-, and tetracycline-resistant *Campylobacter* populations are issues of concern in public health.

Introduction

THERMOPHILIC SPECIES of *Campylobacter* spp. are considered as the main cause for bacterial gastroenteritis worldwide. Most of the campylobacteriosis, ~95%, are caused by *Campylobacter jejuni*, followed by *Campylobacter coli* with 5%.^{3,22} Among the different risk factors in the acquisition of the infection, it is well known that the handling and/or the consumption of chicken meat are the main causes.³²

Antimicrobial treatment of campylobacteriosis is recommended only in severe gastroenteritis or immunocompromised patients, and the risk of treatment failure is present when the infection is caused by resistant isolates. Quinolones and macrolides are the drugs of choice in human campylobacteriosis, followed by tetracyclines as an alternative drug.²¹ Therefore, considering the main cause of infection, it is a matter of concern for public health the investigation of the data of antimicrobial resistance among the *Campylobacter* spp. isolates from poultry and poultry products.

Production of broiler chicks is designed worldwide in several consecutive stages. Three to five pedigree farms maintain the purity of the different broiler breeds. They sell embryonated eggs to the primary breeder companies: great grandparent breeder farms and grandparent breeder farms. Subsequently, they sell hatching eggs to become meat birds and layers at the production farms: parent farms and broiler farms. At each stage, the number of birds increases exponentially.

The prevalence rates of the *Campylobacter* spp. in poultry farms are highly variable among the European countries.¹⁶ Prevalence depends on climatic, biosecurity, flock production system, and rearing conditions in each country.¹¹

Antibiotics have been widely used in animal production for decades worldwide. However, owing to the emergence of microbes resistant to antibiotics that are used to treat human and animal infections, the European Union has banned the use of antimicrobials in feed as growth promoters from 1 January of 2006, and only certain compounds are allowed for the treatment of animal diseases.

¹Campylobacter, Yersinia and Vibrio Laboratory, National Microbiology Centre, National Institute of Health "Carlos III", Madrid, Spain.

²Central Veterinary Laboratory, Department of Bacteriology, Spanish Minister of Agriculture, Food and Environment, Algete, Madrid, Spain.

³COBB Spain, Alcalá de Henares, Madrid, Spain.

There are a variety of studies about the resistance rates against antimicrobials of the avian *Campylobacter* spp. isolates in different countries. Most of them reflect the diversity of the resistance rates among countries and even within a single country.¹² There are some studies in Spain about the rates of *C. jejuni* and *C. coli* resistance in isolates recovered from poultry, and most of them cover a limited number of isolates.^{7,20,23,29} Most of them emphasize the high resistance rates of fluoroquinolones and tetracyclines. The resistance rates against several compounds, such as fluoroquinolones, tetracyclines, and beta-lactams, are highly variable worldwide and range between total susceptibility and 100% of resistance.^{4,6,14,15,27,35} On the other hand, the resistance rates against macrolides are generally low: in most cases, between 0.3% and 20% in most of the countries.¹² Further, the macrolide resistance is usually linked to *C. coli*.^{12,18} Resistance to aminoglycosides and phenicols is, with few exceptions,^{4,30} low, ranging from <0.1% to 36%.^{2,35}

The aim of our study was to monitor the resistance against eight antimicrobials of the *Campylobacter* strains isolated during 4 years (2002–2005) in the early stages of the broiler production (5 grandparent breeder broiler farms and 12 parent breeder broiler farms) in Spain.

Materials and Methods

Characteristics of the farms

During the 4 years of the study period (2002–2005), five grandparent breeder broiler farms (GPBFs) were sampled and investigated for the presence of *Campylobacter* spp. These five farms are located in a central province of Spain, within an area of ~30 km². Birds are moved to the GPBFs at about 20 weeks of age from two rearing farms (RFs) where birds are raised from the hatcheries. During the study, 18 different flocks inhabited the GPBFs. The next stage, parent breeders are produced from fertile eggs of the grandparent flocks, and are reared, housed, and managed in the parent breeder broiler farms (PBFs) after their arrival from the GPBF hatcheries at 1-day old. In any case, a traceability of PBF birds was possible for each flock.

Thirteen PBFs were investigated, and one flock of each was sampled. The PBFs are located in 13 different Spanish provinces that are different to the GPBF's province.

While GPBFs are facilities with high biosecurity measures, PBFs are more heterogeneous in their biosecurity characteristics, but all the farms chosen for the study are *Salmonella*- and pleuropneumonia-like organism- (PPLO, such as *Mycoplasma gallisepticum*) free.

Some of the birds at these stages of production enter the food chain. For example, there are several selections of males during the productive life of the grandparent breeders, at least one selection at around 6 weeks of age in which the unselected males are destined for the slaughterhouse. Further, at the end of the productive life of birds (around 60 weeks old), all of them are processed as meat derivatives or meat broth.

As per the recommendations of the EU (see the European Parliament resolution of 27 October 2011 on the public health threat of antimicrobial resistance, accessible through www.europarl.europa.eu/sides/getDoc.do?pubRef=-//EP//TEXT+TA+P7-TA-2011-0473+0+DOC+XML+V0//EN&language=EN last accession 29/3/2012), hygiene measures and good

husbandry minimize the need for antibiotics, and they are only used when needed for the actual treatment of the disease with the correct dosage, dose intervals, and duration. As stated by the producers, no disease affected the animals during the study, and therefore the animals in the farms of study received no antimicrobial treatment.

Sampling scheme: *Campylobacter* spp. isolation and identification

As an initial step in our study, the RFs and three GPBFs were sampled with the objective of confirming the presence or absence of *Campylobacter* spp. in birds without taking into account the age of the flocks. We confirmed the high prevalence of the *Campylobacter* spp. in the sampled GPBF birds (flocks D [43 weeks], G [57 weeks], and O [57 weeks]; see Table 1) and the absence of *Campylobacter* in the RFs.

After ascertaining the high prevalence of *Campylobacter* spp. in the sampled GPBF birds, several consecutive flocks were sampled in each of the GPBFs. We chose one sampling period by flock in their first weeks of production, and in all the cases, the prevalence of the *Campylobacter* spp. was at least 30%. Routinely, we continued sampling RFs, and they largely remained negative for the *Campylobacter* spp. with two exceptions: flocks M and Q (see Table 1).

For the next production stage at the PBFs, we investigated one flock by each farm. Previous data in these farms confirmed that the prevalence was independent of the age of the birds; therefore, flocks from 5 to 26 weeks were studied. Detailed information on the number of samples investigated in each flock and farm is shown in Table 1.

In all the cases, the cloacal samples were taken from individual birds using sterile swabs (Amies medium; Pronadisa), and within a period of <6 hr, the swabs were streaked onto two selective media: Karmali (CM0935B; Oxoid) and Abeyta-Hunt-Bark Agar (AHBm) (AHBm prepared following the FDA recommendations: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM061209> last accession to the webpage: 13/10/2012) and cultured in a microaerobic atmosphere at 42°C for 48 hr. Presumptive colonies were propagated in Columbia agar supplemented with 5% of sheep blood (Becton & Dickinson). Only one colony per sampled poultry was investigated. After 24 hr, at 42°C, the species were identified by means of the hippurate test, as previously described.³³ Doubtful identifications were confirmed using a previously described multiplex PCR.¹ The isolates were stored at –80°C in a brain–heart infusion broth (BHI broth; Oxoid) supplemented with 15% of glycerol.

Susceptibility tests

After a freeze storage period, the isolates were propagated in Columbia agar supplemented with 5% of sheep blood (Becton & Dickinson). In those viable isolates (see Table 1), the disk-diffusion method (DDM) was used for the susceptibility test, according to the CLSI guidelines and recommendations: that is, the density of inocula, time of incubation, and quality-control strain *C. jejuni* ATCC 33560 at each batch of tests, among others.⁵ The method was carried out with the following antimicrobials purchased from Oxoid: nalidixic acid (NAL; 30 µg, CT0031B), ciprofloxacin (CIP; 5 µg, CT0425B), erythromycin (ERY; 15 µg, CT020B), gentamicin (GEN; 10 µg,

TABLE 1. DATA OF ISOLATES TESTED BY FARM AND FLOCK

Poultry production stage	Farm	Flock	Sampling year	No. of birds/farm	Age of selected birds (weeks)	Campylobacter positive swabs/total cloacal swabs	Prevalence (%)	No. of tested isolates/total isolates
GPBF	1	A	2002–2003	14,000	28	79/80	98.7	74/79
		B	2003	14,000	25	26/30	86.7	16/26
		C	2004	14,000	26	18/40	45	12/18
	2	D	2002	14,000	43	65/80	81.2	60/65
		E	2002–2003	14,000	21	20/40	50	15/20
		F	2003–2004	14,000	37	15/15	100	8/15
	3	G	2002	16,000	57	39/40	97.5	38/39
		H	2002–2003	16,000	23	15/15	100	13/15
		I	2003–2004	16,000	27	20/20	100	15/20
	4	J	2005	16,000	30	37/80	46.2	27/37
		L	2002–2003	16,000	23	67/80	83.7	63/67
		M ^a	2003	16,000	18	73/80	91.2	60/73
	5	N	2004	16,000	23	16/40	40	12/16
		O	2002	16,000	57	70/80	87.5	69/70
		P	2002–2003	16,000	23	78/80	97.5	74/78
		Q ^a	2003	16,000	13	27/60	45	27/27
		R	2004	16,000	20	30/60	50	24/30
PBF	P1	P-A	2003	8,300	16	9/10	90	9/9
	P2	P-B	2003	11,600	16	20/40	50	18/20
	P3	P-C	2003	16,500	17	37/40	92.5	28/37
	P4	P-D	2003	8,800	11	6/20	30	6/6
	P5	P-E	2003	16,000	14	19/30	63.3	19/19
	P6	P-F	2003	16,000	25	35/40	87.5	19/35
	P7	P-G	2003	12,000	10	10/15	66.7	10/10
	P8	P-H	2003	12,000	5	25/30	83.3	25/25
	P9	P-I	2003	20,000	26	23/25	92	23/23
	P10	P-J	2003	20,000	12	22/30	73.3	18/22
	P12	P-L	2004	8,000	9	16/30	53.3	12/16
	P13	P-M	2004	16,000	18	15/30	50	11/15

Characteristics as the number of birds and their age at the time of sampling are shown. The number of *Campylobacter* spp.-positive swabs, the prevalence, and the number of isolates in which the disk-diffusion method was performed are also reflected.

^aSamples obtained in the rearing farms (RFs) before the placement of the birds to their production farm (GPBF). The RFs are not a stage in poultry production by themselves; they are considered as a part of the GPBFs where the birds are raised from hatcheries to 20 weeks old.

PBFs, parent breeder broiler farms; GPBFs, grandparent breeder broiler farms.

CT0794B), amoxicillin (AMX; 25 µg, CT0061B), amoxicillin plus clavulanic acid (AMC; 30 µg, CT0223B), chloramphenicol (CHL; 30 µg, CT0013B), and tetracycline (TCY; 30 µg, CT0054B). Each antimicrobial has been codified following the WHONET recommendations.³¹

The Mueller–Hinton agar supplemented with 5% of defibrinated sheep blood (Becton & Dickinson) was used as the culture medium in all the susceptibility tests.

The diameters of the inhibition zones were measured with a digital caliper (Mitutoyo Corp.) in millimeters and transferred to a database. To discriminate between resistant and susceptible isolates, we have followed the cutoff values provided by the Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (available at http://sfm-microbiologie.org/UserFiles/file/CASFM/casfm_2010.pdf Last accession 1/19/2012). The diameters of the inhibition zones of our isolates were compared with the selected antimicrobial cutoff values for the inhibition zones. Diameters in millimeters lesser than those of the cutoff values were considered as resistant. To assure the reproducibility of the results, a selection of isolates by flock were rechecked by the DDM (data not shown).

Following the previously published criteria,¹⁷ we have considered an isolate as multidrug resistant (MDR) when it is resistant to three or more groups of the antimicrobials.

Statistical analysis of results

The prevalence of each antimicrobial resistance in the isolates was compared statistically with the *Campylobacter* species using χ^2 analyses. Statistical significance was defined at the $p \leq 0.05$ or $p \leq 0.001$ levels when applicable. Statgraphics plus software (Statistical Graphics Corporation) was used for all statistical analyses.

Results

Total resistance data among poultry isolates

After the sampling periods, we obtained 932 poultry isolates during the 4 years of the study. The susceptibility of the viable isolates (805) was investigated. From the 805 isolates analyzed, 697 were identified as *C. jejuni* and 108 as *C. coli*.

As seen in Table 2, the NAL and CIP resistances were the most prevalent in our study, followed by TCY, AMX, and ERY resistances; besides, 14.4% of the isolates could be considered as MDR. Two different MDR resistotypes were identified: NAL^R CIP^R AMX^R TCY^R and NAL^R CIP^R ERY^R TCY^R. The pan-susceptible isolates were found to be at 10.3% of the total. In any case, no resistance against AMC, GEN, or CHL was detected in any of the isolates from the study.

TABLE 2. GLOBAL RESISTANCE PERCENTAGES AND COMPARISON OF RESISTANCE BETWEEN PRODUCTION STAGES

Antimicrobial	Grandparents		Parents		Whole data		Statistics p-Value ^a
	No. of strains/total	Percentage (%)	No. of strains/total	Percentage (%)	No. of strains/total	Global percentage (%)	
NAL ^R	432/607	71.2	171/198	86.4	603/805	74.9	<0.001
CIP ^R	430/607	70.8	165/198	83.3	595/805	73.9	<0.001
TCY ^R	242/607	39.9	146/198	73.7	388/805	48.2	<0.001
AMX ^R	79/607	13.0	80/198	40.4	159/805	19.8	<0.001
ERY ^R	—	—	25/198	12.6	25/805	3.1	<0.001
MDR	40/607	6.6	76/198	38.4	116/805	14.4	<0.001
Pansusceptible	65/607	10.7	18/198	9.1	83/805	10.3	>0.5

^ap-value obtained in the statistical comparison between the two stages of production.

MDR and pan-susceptible percentages have also been represented. Each antimicrobial has been codified following the WHONET recommendations: nalidixic acid (NAL), ciprofloxacin (CIP), erythromycin (ERY), gentamicin (GEN), amoxicillin (AMX), amoxicillin plus clavulanic acid (AMC), chloramphenicol (CHL), and tetracycline (TCY).

MDR, multidrug resistant.

Comparison of resistance by the production-rearing step

About 607 and 198 out of the 805 isolates belonged to the GPBFs and PBFs, respectively. The comparison of the resistance percentages between the two production steps showed statistically significant differences ($p < 0.001$) in the susceptibilities to all the antimicrobials tested. In all cases, as shown in Table 2, the percentages of resistance are clearly higher in the PBFs than in the GPBFs.

The percentage of TCY resistance (73.7%) among the PBF isolates is almost twice that in the GPBF isolates (39.9%). It is remarkable that none of the GPBF isolates were resistant to ERY as opposed to 12.6% of the PBF isolates.

Regarding the MDR populations, the prevalence of MDR at the PBFs was almost six times compared to the GPBFs (38.4% in PBFs vs. 6.6% in GPBFs). Moreover, two different MDR phenotypes were found at the PBFs (NAL^R CIP^R AMX^R TCY^R and NAL^R CIP^R ERY^R TCY^R) compared to the one in the GPBFs (NAL^R CIP^R AMX^R TCY^R).

Total comparison of resistance between *C. jejuni* and *C. coli*

As shown in Table 3, statistically significant differences were found ($p < 0.001$) for all the tested antimicrobials with the exception of AMX.

Resistances against NAL and ciprofloxacin were higher in *C. jejuni* than in *C. coli* (for example, 77.2% vs. 60.2%, $p < 0.001$, for NAL). Among the *C. coli* isolates, the TCY resistance was the main resistance, and it also was significantly higher than in the *C. jejuni* isolates (96.3% vs. 40.7%, $p < 0.001$). The ERY resistance was restricted to a single population of *C. coli* isolates (farm P8, belonging to PBFs, as seen in Table 1).

It is remarkable that none of the *C. coli* isolates in our study could be considered as pan-susceptible as opposed to the 11.9% of the *C. jejuni* isolates. In general, the *C. coli* isolates tended to be more MDR than *C. jejuni* (33.3% vs. 11.5%, $p < 0.001$).

Comparison of the resistance between *C. jejuni* and *C. coli* at each production stage

Among the 607 isolates from the GPBFs, 573 were identified as *C. jejuni*, whereas 34 were *C. coli*. As shown in Table 4, all the *C. coli* isolates from this step of poultry production were resistant only to TCY, with the susceptibility for the rest of the antimicrobials. These *C. coli* isolates, from flocks M and Q, were genetically related, and this was proved with by means of molecular markers, as shown in a previous work.²⁵

Regarding the 198 isolates from the 12 parent breeder broiler farms (PBFs), 124 were identified as *C. jejuni* and 74 as

TABLE 3. TOTAL COMPARISON OF RESISTANCE BETWEEN *CAMPYLOBACTER JEJUNI* AND *CAMPYLOBACTER COLI*

<i>Antimicrobial</i>	<i>No. of strains/total C. jejuni</i>	<i>C. jejuni (%)</i>	<i>No. of strains/ total C. coli</i>	<i>C. coli (%)</i>	<i>Statistics p-Value^a</i>
NAL ^R	538/697	77.2	65/108	60.2	<0.001
CIP ^R	530/697	76.0	65/108	60.2	<0.001
TCY ^R	284/697	40.7	104/108	96.3	<0.001
AMX ^R	144/697	20.7	15/108	13.9	>0.05
ERY ^R	—	0.0	25/108	23.1	<0.001
MDR	80/697	11.5	36/108	33.3	<0.001
Pan-susceptible	83/697	11.9	—	0.0	<0.001

^ap-value obtained in the statistical comparison between the two species.

MDR and pan-susceptible percentages have also been represented. Each antimicrobial has been codified following the WHONET recommendations: NAL, CIP, ERY, GEN, AMX, AMC, CHL, and TCY.

TABLE 4. COMPARISON OF RESISTANCE BETWEEN *CAMPYLOBACTER JEJUNI* AND *CAMPYLOBACTER COLI* IN EACH PRODUCTION STAGE

Antimicrobial	GPBF					PBF				
	No. of strains/ total <i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (%)	No. of strains/ total <i>C. coli</i>	<i>C. coli</i> (%)	Statistics p-Value	No. of strains/ total <i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (%)	No. strains/ total <i>C. coli</i>	<i>C. coli</i> (%)	Statistics p-Value ^a
NAL ^R	432/573	75.4	—	0.0	<0.001	100/124	80.6	65/74	87.8	>0.05
CIP ^R	430/573	75.0	—	0.0	<0.001	76/124	61.3	70/74	94.6	>0.1
TCY ^R	208/573	36.3	34/34	100.0	<0.001	65/124	52.4	15/74	20.3	<0.001
AMX ^R	79/573	13.8	—	0.0	<0.05	—	0.0	25/74	33.8	<0.001
ERY ^R	—	0.0	—	0.0	—	40/124	32.3	36/74	48.6	<0.05
MDR	40/573	7.0	—	0.0	>0.05	18/124	14.5	—	0.0	<0.001
Pan-susceptible	65/573	11.3	—	0.0	<0.05	—	—	—	—	—

^ap-value obtained in the statistical comparison between the two species at each production stage.

MDR and pan-susceptible percentages have also been represented. Each antimicrobial has been codified following the WHONET recommendations: NAL, CIP, ERY, GEN, AMX, AMC, CHL, and TCY.

C. coli. As shown in Table 4, most of the *C. coli* isolates were TCY resistant (94.6%). It is noteworthy that the AMX resistance was more than twice higher in *C. jejuni* than in *C. coli* (52.4% vs. 20.3%). The pan-susceptible isolates were detected only among the *C. jejuni* isolates (14.5%). On the other hand, almost half (48.6%) of the *C. coli* isolates from this step of production were of the MDR phenotypes: NAL^R CIP^R AMX^R TCY^R and NAL^R CIP^R ERY^R TCY^R.

Discussion

Campylobacteriosis caused by resistant strains limit the treatment or could cause treatment failure of the disease. Risk studies point to poultry handling or consumption as the main risk factor in acquiring the disease. Therefore, monitoring and control of the resistances of the *Campylobacter* spp. in poultry farms are major issues.

For resistance detection, the DDM is a well-known established method described in several articles¹⁷ as suitable for the screening of large number of isolates. Although it does not provide a direct MIC (minimal inhibitory concentration) value, it is commonly accepted that the results of DDM (in terms of resistant or susceptible) are comparable to the agar-dilution or E-test results.¹⁷ Further, it is accepted by the CLSI and other organizations (*i.e.*, EUCAST) for the discrimination between resistant and susceptible strains.

Our study could be considered as sufficiently representative of the general data in Spain, because (1) GPBFs together with PBFs cover almost all of the Spanish territory, and (2) GPBF production provides almost 50% of the parent broiler production in Spain.

As seen in Table 2, the resistance percentages were always higher in the PBFs than in the GPBFs. There were also more MDR and less pan-susceptible strains in the PBFs than in the GPBFs. A possible explanation might be that the lesser biosecurity measures in the PBFs allowed different antimicrobial-resistant bacteria from the outside environment to reach the birds and colonize them. Another explanation might be the higher prevalence of *C. coli* in the PBFs than in the GPBFs in our study, because it is recognized that *C. coli* are more resistant to antimicrobials than *C. jejuni*.^{6,8}

All the sampling periods in the study reached a *Campylobacter* prevalence $\geq 30\%$, which gave a total number of isolates (805) enough to ensure the robustness of the study and the observation of a true trend of the susceptibility to antimicrobials in the two stages of poultry production. With the future objective of investigating the resistance mechanisms of the isolates, a selection of resistant and susceptible isolates were selected and rechecked by the DDM, and their MIC was confirmed by the E-test (BioMerieux) with no variation of results (data not shown).

Analyzing the data from our study, the highest percentages of resistance were against quinolones and fluoroquinolones with 74.9% and 73.9% for NAL and CIP, respectively. There were significant differences between the two species, *C. jejuni* being more fluoroquinolone resistant than *C. coli*, although most of the articles show higher rates of fluoroquinolone resistance among the *C. coli* populations of poultry origin.⁸ The quinolone and fluoroquinolone resistance rates vary worldwide between susceptibility²⁷ and

extremely high rates.^{4,29} In our study, the CIP total resistance percentage, even though high at 73.9%, is lesser than in other studies conducted in Spain (99%²⁹ and 95.45%,²⁰ in both cases at slaughterhouses). Further, our results are comparable with those for other countries, for example, in Italy, 80% (*C. jejuni*) and 82.6% (*C. coli*) resistances to NAL.³⁰ In those studies, the same screening method was performed (DDM). It has been shown that the fluoroquinolone resistance did not decrease several years after the ban of the use of quinolones as growth promoters in the United States.^{28,34} One possible reason for this is that the fluoroquinolone resistance seems to provide a certain advantage in the colonization of birds without causing a loss to their biological fitness.¹⁹ However, 25% reduction in average resistance to quinolone was observed compared to a study conducted 10 years ago,²⁹ and it is clearly lesser than in a recent study.²⁰ Good biosecurity measures could allow the producers to reduce the use of antimicrobials in animal therapeutics at the farm level and limit the presence of the resistant populations of bacteria. The poultry industry must continue with their good practices in the use and dosage of antimicrobials in the production of broilers.

TCY resistance was the second largest in our study, with a total percentage of 48.2%. The prevalence of TCY resistance in the *Campylobacter* spp. varies among countries between susceptibility²⁷ and high rates of close to 100%.^{4,14} Our data are comparable to those from other countries, for example, the United States, in slaughterhouses at 46%.³⁵ It is important to note the high percentage of TCY resistance among the *C. coli* isolates, at 96.3% of the total samples (Table 3). This result is similar to that of the study of de Jong and collaborators on the avian *C. coli* isolates in Spain⁷ (93.1%). The resistance to TCY has been linked to *C. coli* in several studies⁸ as caused by the regular use of TCYs in a swine husbandry.²⁴ Even though swine is the main animal host of *C. coli*, it also appears in poultry at a relatively high frequency.¹³

The percentage of the AMX resistance may be considered as relatively low (17.3%) and is lesser than in a previous study conducted in Spain,²⁹ where the beta-lactam tested (ampicillin) gave 55% of resistance in *Campylobacter* of broiler origin. Although the beta-lactam resistance values are variable among the countries and even within countries, for example, France 13%–35%,²¹ our data are similar to those from other countries.¹² Since no beta-lactams are used in antibiotic treatment of human campylobacteriosis, the European Food Safety Authority (EFSA) considers their surveillance as of low priority.⁹

Macrolides are considered as the treatment of choice for severe campylobacteriosis, and the resistance rates are generally low among avian isolates (0.3%–20%).¹² In our study, the total resistance (*C. jejuni* plus *C. coli*) was relatively low (2.3%) and lesser than that found by us (3.8%) in a previous study in Spain with human isolates.²⁶ Besides, they were similar to those found in other European countries such as UK (2%).¹² It is noteworthy that all the ERY-resistant isolates from our study belonged to a single *C. coli* population isolated from a PBF (P8, see Tables 1 and 3). Similar to TCY, macrolide resistance has been usually linked with *C. coli*, and it is believed that the cause is because of the use of macrolide derivatives (tylosin) as the growth promoter for swine, years ago.¹⁰ The rate of the ERY

resistance among our *C. coli* isolates (23.1%) is very similar to that found in a recent study conducted at European level at 24.1%.⁷

No CHL or GEN resistance was found during the study. With the exception of a recent study with cloacal isolates from China⁴ and data from Italy,³⁰ in general, the CHL and GEN resistances are documented as of low occurrence among the *Campylobacter* strains.¹²

In our study, pan-susceptible isolates constituted 10.3% despite the fact that they shared the same ecological niche with the rest of the resistant isolates. In most cases, those pan-susceptible populations did not persist between consecutive flocks in the GPBFs (not shown in this study).

In our study, the MDR percentage was significantly higher in *C. coli* than in *C. jejuni* (33.3% vs. 11.5%, respectively, $p < 0.001$, Table 3), which supports the previous studies showing a high frequency of MDR phenotypes in *C. coli* from turkeys and broilers.^{6,8} Further, none of the *C. coli* isolates in our study could be considered as pan-susceptible.

In conclusion, our study gives new data on the antimicrobial resistance prevalence among the zoonotic pathogens *C. jejuni* and *C. coli*. Differences in the prevalence and patterns of resistances were found between the two species and at different stages of broiler production. The resistance percentages are clearly lesser than in previous studies conducted in Spain several years ago and are comparable to those in other European countries. Surveillance of the *Campylobacter* MDR isolates and, specifically, certain *C. coli*-resistant populations should be the issues of interest in public health.

Acknowledgments

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III of the Spanish Ministry of Science and Innovation (PI05/00042). We gratefully thank Juana Bustos for her assistance in the analysis of data and Cristina Acebal for her critical review of the manuscript.

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. Al Amri, A., A.C. Senok, A.Y. Ismaeel, A.E. Al-Mahmeed, and G.A. Botta. 2007. Multiplex PCR for direct identification of *Campylobacter* spp. in human and chicken stools. *J. Med. Microbiol.* 56:1350–1355.
2. Bardon, J., M. Kolar, L. Cekanova, P. Hejnar, and D. Koukalova. 2009. Prevalence of *Campylobacter jejuni* and its resistance to antibiotics in poultry in the Czech Republic. *Zoonoses Public Health* 56:111–116.
3. Bywater, R., H. Deluyker, E. Deroover, A. de Jong, H. Marion, M. McConville, T. Rowan, T. Shryock, D. Shuster, V. Thomas, et al. 2004. A European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and commensal bacteria isolated from food-producing animals. *J. Antimicrob. Chemother.* 54:744–754.
4. Chen, X., G.W. Naren, C.M. Wu, Y. Wang, L. Dai, L.N. Xia, P.J. Luo, Q. Zhang, and J.Z. Shen. 2010. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates in broilers from China. *Vet. Microbiol.* 144:133–139.

5. [CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently isolated or fastidious Bacteria; Approved Guideline-Second Edition. CLSI Document M45-A2 Vol. 30 No 18. Wayne, PA: CLSI.
6. D'Lima, C B., W.G. Miller, R.E. Mandrell, S.L. Wright, R.M. Siletzky, D.K. Carver, and S. Kathariou. 2007. Clonal population structure and specific genotypes of multidrug-resistant *Campylobacter coli* from Turkey. Appl. Environ. Microbiol. 73:2156–2164.
7. de Jong, A., V. Thomas, S. Simjee, K. Godinho, B. Schiessl, U. Klein, P. Butty, M. Valle, H. Marion, and T.R. Shryock. 2012. Pan-European monitoring of susceptibility to human-use antimicrobial agents in enteric bacteria isolated from healthy food-producing animals. J. Antimicrob. Chemother. 67:638–651.
8. Desmonts, M.H., F. Dufour-Gesbert, L. Avrain, and I. Kempf. 2004. Antimicrobial resistance in *Campylobacter* strains isolated from French broilers before and after antimicrobial growth promoter bans. J. Antimicrob. Chemother. 54:1025–1030.
9. EFSA. 2008. Harmonised monitoring of antimicrobials resistance in *Salmonella* and *Campylobacter* isolates from food animals in the European Union. Clin. Microbiol. Infect. 14:522–533.
10. Gibreel, A., V.N. Kos, M. Keelan, C.A. Trieber, S. Levesque, S. Michaud, and D.E. Taylor. 2005. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: molecular mechanism and stability of the resistance phenotype. Antimicrob. Agents Chemother. 49:2753–2759.
11. Griekspoor, P., E.O. Engvall, B. Olsen, and J. Waldenstrom. 2010. Multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* from broilers. Vet. Microbiol. 140:180–185.
12. Gyles, C.L. 2008. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. Anim. Health Res. Rev. 9:149–158.
13. Horrocks, S.M., R.C. Anderson, D.J. Nisbet, and S.C. Ricke. 2009. Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. Anaerobe 15:18–25.
14. Kim, H.J., J.H. Kim, Y.I. Kim, J.S. Choi, M.Y. Park, H.M. Nam, S.C. Jung, J.W. Kwon, C.H. Lee, Y.H. Kim, et al. 2010. Prevalence and characterization of *Campylobacter* spp. isolated from domestic and imported poultry meat in Korea, 2004–2008. Foodborne Pathog. Dis. 7: 1203–1209.
15. Krutkiewicz, A., A. Salamaszynska-Guz, M. Rzewuska, D. Klimuszko, and M. Binek. 2009. Resistance to antimicrobial agents of *Campylobacter* spp. strains isolated from animals in Poland. Pol. J. Vet. Sci. 12:465–472.
16. Lee, M.D., and D.G. Newell. 2006. *Campylobacter* in poultry: filling an ecological niche. Avian Dis. 50:1–9.
17. Lehtopolku, M., U.M. Nakari, P. Kotilainen, P. Huovinen, A. Siitonen, and A.J. Hakanen. 2010. Antimicrobial susceptibilities of multidrug-resistant *Campylobacter jejuni* and *C. coli* strains: *in vitro* activities of 20 antimicrobial agents. Antimicrob. Agents Chemother. 54:1232–1236.
18. Luangtongkum, T., B. Jeon, J. Han, P. Plummer, C.M. Logue, and Q. Zhang. 2009. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. Future Microbiol. 4:189–200.
19. Luo, N., S. Pereira, O. Sahin, J. Lin, S. Huang, L. Michel, and Q. Zhang. 2005. Enhanced *in vivo* fitness of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter jejuni* in the absence of antibiotic selection pressure. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102:541–546.
20. Melero, B., P. Juntunen, M.L. Hanninen, I. Jaime, and J. Rovira. 2012. Tracing *Campylobacter jejuni* strains along the poultry meat production chain from farm to retail by pulsed-field gel electrophoresis, and the antimicrobial resistance of isolates. Food Microbiol. 32:124–128.
21. Moore, J.E., M.D. Barton, I.S. Blair, D. Corcoran, J.S. Dooley, S. Fanning, I. Kempf, A.J. Lastovica, C.J. Lowery, M. Matsuda, et al. 2006. The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. Microbes Infect. 8:1955–1966.
22. Nelson, J.M., T.M. Chiller, J.H. Powers, and F.J. Angulo. 2007. Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* species and the withdrawal of fluoroquinolones from use in poultry: a public health success story. Clin. Infect. Dis. 44:977–980.
23. Oporto, B., R.A. Juste, and A. Hurtado. 2009. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance profiles of *Campylobacter jejuni* isolated from cattle, sheep, and free-range poultry faeces. Int. J. Microbiol. 2009:456573.
24. Payot, S., S. Dridi, M. Laroche, M. Federighi, and C. Magras. 2004. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter coli* isolated from fattening pigs in France. Vet. Microbiol. 101:91–99.
25. Perez-Boto, D., F.J. Garcia-Pena, J.C. Abad-Moreno, M.D. Hurtado-Pizarro, I., Perez-Cobo, and M.A. Echeita. 2010. Drinking water as the source of *Campylobacter coli* infection in grandparent heavy breeders. Avian Pathol. 39:483–487.
26. Perez-Boto, D., J.A. Lopez-Portoles, C. Simon, S. Valdezate, and M.A. Echeita. 2010. Study of the molecular mechanisms involved in high-level macrolide resistance of Spanish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains. J. Antimicrob. Chemother. 65:2083–2088.
27. Pleydell, E.J., L. Rogers, E. Kwan, and N.P. French. 2010. Low levels of antibacterial drug resistance expressed by Gram-negative bacteria isolated from poultry carcasses in New Zealand. N. Z. Vet. J. 58:229–236.
28. Price, L.B., L.G. Lackey, R. Vailles, and E. Silbergeld. 2007. The persistence of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* in poultry production. Environ. Health Perspect. 115:1035–1039.
29. Saenz, Y., M. Zarazaga, M. Lantero, M.J. Gastanares, F. Baquero, and C. Torres. 2000. Antibiotic resistance in *Campylobacter* strains isolated from animals, foods, and humans in Spain in 1997–1998. Antimicrob. Agents Chemother. 44:267–271.
30. Sammarco, M.L., G. Ripabelli, I. Fanelli, G.M. Grasso, and M. Tamburro. 2010. Prevalence and biomolecular characterization of *Campylobacter* spp. isolated from retail meat. J. Food Prot. 73:720–728.
31. Stelling, J.M., and T.F. O'Brien. 1997. Surveillance of antimicrobial resistance: the WHONET program. Clin. Infect. Dis. 24 Suppl. 1:S157–S168.
32. Tam, C.C., C.D. Higgins, K.R. Neal, L.C. Rodrigues, S.E. Millership, and S.J. O'Brien. 2009. Chicken consumption and use of acid-suppressing medications as risk factors for *Campylobacter enteritis*, England. Emerg. Infect. Dis. 15:1402–1408.
33. Waino, M., D.D. Bang, M. Lund, S. Nordentoft, J.S. Andersen, K. Pedersen, and M. Madsen. 2003. Identification of campylobacteria isolated from Danish broilers

- by phenotypic tests and species-specific PCR assays. *J. Appl. Microbiol.* **95**:649–655.
34. **Zhang, Q., J. Lin, and S. Pereira.** 2003. Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* in animal reservoirs: dynamics of development, resistance mechanisms and ecological fitness. *Anim. Health. Res. Rev.* **4**:63–71.
35. **Zhao, S., S.R. Young, E. Tong, J.W. Abbott, N. Womack, S.L. Friedman, and P.F. McDermott.** 2010. Antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates from retail meat in the United States between 2002 and 2007. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**:7949–7956.

Address correspondence to:

David Pérez-Boto, BSc

Laboratorio de *Campylobacter*

Yersinia y *Vibrio*

Centro Nacional de Microbiología

Instituto de Salud Carlos III

Ctra. Majadahonda-Pozuelo, km. 2,2

Majadahonda

Madrid 28220

España

E-mail: dpboto@isci.iii.es

Capítulo II

Artículo 5

“Molecular mechanisms of quinolone, macrolide, and tetracycline resistance among *Campylobacter* isolates from initial stages of broiler production”

“Mecanismos moleculares de resistencia a quinolonas, macrólidos y tetraciclina entre aislados de *Campylobacter* procedentes de etapas iniciales en la producción de broilers”

Resumen del artículo:

Objetivos: El objetivo de este trabajo fue investigar los mecanismos de resistencia de cepas de *Campylobacter jejuni* y *C. coli*, aisladas de dos etapas iniciales de producción de broilers en España, frente a tres grupos de antimicrobianos: Quinolonas, macrólidos y tetraciclina.

Métodos: Basándonos en un estudio previo (artículo 4) en el que se determinaron los porcentajes de resistencia de 805 cepas (697 *C. jejuni* y 108 *C. coli*) aisladas de 29 lotes de aves en dos etapas iniciales de producción de pollo de engorde (17 lotes de abuelas y 12 de reproductoras), se determinó el valor de CMI de una selección de ellas (una cepa por resistotipo en cada lote de aves (51 *C. jejuni* y 10 *C. coli*) mediante E-test siguiendo las especificaciones y valores de corte del *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI). A efectos de comparación de cepas se utilizaron dos marcadores moleculares: *KpnI*-PFGE y RFLP-PCR del gen *flaA*. La selección de cepas para investigar los mecanismos de resistencia se realizó según la CMI frente a quinolonas, macrólidos y tetraciclina: 26 cepas resistentes a quinolonas, 3 cepas resistentes a macrólidos (solo hubo una población de *C. coli* resistente a este antibiótico) y 39 cepas resistentes a tetraciclina. Para estudiar la resistencia a quinolonas se secuenció la región QRDR del gen *gyrA*, donde se concentran las mutaciones que causan resistencia a quinolonas. Para la investigación de resistencia a macrólidos se secuenció parte del gen del 23S ARNr y los genes ribosómicos *rplD* y *rplV*. Finalmente, la resistencia a tetraciclina se investigó por detección del gen *tetO* mediante una PCR específica diseñada por nosotros y su localización (plásmido o cromosoma) mediante *Southern blot*. En una selección de cepas se investigó la conjugación del plásmido portador de resistencia a tetraciclina.

Resultados: En 26 de los 29 lotes de aves se aislaron cepas de *Campylobacter* resistentes a quinolonas, en ellas, los valores de CMI fueron ≥ 256 mg/L para el ácido nalidíxico y ≥ 32 mg/L (con dos excepciones) para el ciprofloxacino. La secuenciación del gen *gyrA* mostró la mutación Thr86Ile en la región QRDR en todas las cepas resistentes. De forma adicional, en 1 cepa se encontró la mutación Pro104Ser, acompañando a la mutación Thr86Ile, sin variación en los niveles de CMI frente a quinolonas. Sólo una población homogénea (evidenciado por el análisis de marcadores moleculares) de *C. coli* aislada en un lote de reproductoras fue resistente a eritromicina (CMI ≥ 256 mg/L) y en ella, se encontró la mutación A2075G en el gen 23S ARNr en homocigosis (los tres genes que posee *C. coli* estaban mutados). En la investigación de la resistencia a tetraciclina se observó una variedad de CMIs en las cepas resistentes (16 a ≥ 256 mg/L) y en todas ellas se detectó el gen *tetO*. Su localización fue variable, así, en 8 lotes de aves, las cepas resistentes a tetraciclina poseían el gen *tetO* exclusivamente en plásmido, en 10 lotes, en el cromosoma bacteriano exclusivamente, y en 6 lotes de aves podíamos encontrar, dentro de cada lote, diferentes poblaciones de *Campylobacter* con ambas localizaciones. El análisis de las cepas reveló que dentro de una misma población (definida por sus marcadores moleculares) no encontrábamos de forma simultánea *tetO* en ambas localizaciones. El análisis de los plásmidos de resistencia a tetraciclina mostró variedad en sus tamaños moleculares (3.3 a 78.3 Kb), siendo la mayoría alrededor de 60 Kb. Además, pudimos demostrar la naturaleza conjugativa de una selección de plásmidos (4 cepas de *C. jejuni* portadoras de plásmidos, con variaciones en su CMI).

Conclusiones: En este estudio, la mutación Thr86Ile se encontró en todas las cepas analizadas resistentes a quinolonas, manifestando que es la mutación más prevalente en las cepas de *Campylobacter* de origen aviar resistentes a quinolonas, incluso, como en este caso, sin tratamiento previo con quinolonas. La resistencia a macrólidos fue minoritaria, con solo una población de *C. coli* resistente, en la que la mutación A2075G en homocigosis era la causante de la resistencia. Estos datos concuerdan con los publicados donde se asocia a esta especie con la resistencia a macrólidos. En cuanto a la resistencia a tetraciclina, no encontramos asociación entre la CMI y la localización del gen *tetO* (plásmido o cromosoma). Comprobamos como dentro de un mismo lote de aves pueden coexistir poblaciones diferentes de *Campylobacter* con *tetO* en ambas localizaciones. La capacidad de conjugación de los plásmidos de resistencia a tetraciclina es, sin duda, un riesgo en Salud Pública por su capacidad de transmisión a otras cepas presentes en el tracto digestivo de las aves.

Claves del artículo y relación con los objetivos planteados

Todas las claves de este artículo se relacionan con el objetivo 2.2: Mecanismos de resistencia frente a los principales grupos de antimicrobianos en *Campylobacter*.

1. Salvo en dos aislados, los valores de CMI frente a quinolonas y fluoroquinolonas en la selección de cepas resistentes a quinolonas, son los más altos que detecta el método utilizado (E-test).
2. Todas las cepas resistentes a quinolonas/fluoroquinolonas poseían la mutación Thr86Ile en la región QRDR del gen *gyrA*, lo que confirma otros estudios como la más habitual en los aislados que se encuentran en la naturaleza. De forma adicional, un aislado poseía una mutación adicional, Pro104Ser, sin que se observase variación aparente en la CMI para quinolonas.
3. Sólo una población de *C. coli*, aislada en una granja de madres reproductoras (PBFs), fue resistente a macrólidos (eritromicina) con valores de CMI >256 mg/L (los más altos para ese antibiótico con el método utilizado).
4. El mecanismo responsable de la resistencia a macrólidos fue la mutación A2075G en el gen del 23S ARNr. No se observaron variaciones o polimorfismos entre los aislados estudiados.
5. En cuanto a la resistencia a tetraciclina, los valores de CMI fueron variables (16 y ≥ 256 mg/L) sin relación con la especie (*C. coli* o *C. jejuni*) o la etapa de producción.
6. En todos los casos, se detectó la presencia del gen *tetO*, y este se pudo localizar tanto en cromosoma como en plásmido (de tamaños variables).
7. Se demostró la naturaleza conjugativa de una selección de plásmidos portadores de resistencia a tetraciclina, por tanto la naturaleza transmisible de esta resistencia.

ORIGINAL ARTICLE

Molecular mechanisms of quinolone, macrolide, and tetracycline resistance among *Campylobacter* isolates from initial stages of broiler production

D. Pérez-Boto^{1*}, S. Herrera-León¹, F. J. García-Peña², J. C. Abad-Moreno³, and M. A. Echeita¹

¹Unidad de Enterobacterias, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain,

²Laboratorio Central de Veterinaria, Departamento Bacteriología, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Algete, Madrid, Spain, and ³COBB España. Alcalá de Henares, Madrid, Spain

The aim of this study was to investigate the resistance mechanisms of quinolones, macrolides and tetracycline in campylobacter isolates from grandparent and parent broiler breeders in Spain. Twenty-six isolates were investigated for quinolone resistance, three isolates for macrolide resistance and 39 for tetracycline resistance. All of the quinolone-resistant isolates possessed the mutation Thr86Ile in the quinolone resistance-determining region of *gyrA* and one isolate possessed the mutation Pro104Ser. Only one *Campylobacter coli* population (defined by restriction fragment length polymorphism–polymerase chain reaction of *flaA* and pulsed field gel electrophoresis) was resistant to erythromycin, and the mutation A2075G (23S rDNA) was responsible for macrolide resistance. The *tetO* gene was found in all of the tetracycline-resistant isolates. Twenty-two out of the 39 isolates investigated by Southern blot possessed chromosomal location of *tetO* and 17 were located on plasmids. Most of the plasmids with *tetO* were of around 60 kb and conjugation was demonstrated in a selection of them. In conclusion, we showed that Thr86Ile is highly prevalent in quinolone-resistant isolates as well as mutation A2075G in macrolide-resistant isolates of poultry origin. More variability was found for *tetO*. The possibility of horizontal transmission of *tetO* among campylobacter isolates is also an issue of concern in public health.

Introduction

Campylobacter jejuni is the most common zoonotic pathogen in the European Union (EFSA & ECDC, 2013). Moreover, it is the most important bacterial cause of gastroenteritis worldwide (Scallan *et al.*, 2011; On, 2013), even when one considers that data for human infection are underestimated (Toljander *et al.*, 2012).

There are several identified sources of *C. jejuni* (and its closely related species *Campylobacter coli*) infection, such as consumption of raw milk, untreated water, red meat, and contact with pets and farm animals, among others (Whiley *et al.*, 2013). Different studies of risk factors, however, point to the handling or consumption of chicken meat as the main source of infection in humans (Lee & Newell, 2006). Most cases of campylobacteriosis are usually self-limiting and do not require hospitalization. Antibiotic treatment is required, however, when severe enteritis or complications are present, as well as when very young or elderly patients and pregnant women are infected. Macrolides and quinolones are the drugs of choice, with tetracycline as an alternative treatment for campylobacteriosis (Moore *et al.*, 2006). Resistance against quinolones is of concern in many countries (Ge *et al.*, 2013). In Spain, for example, during the 1980s quinolone resistance was 11% in human *C. jejuni*

isolates, while at the end of the 1990s the resistance rates reached 85% (Prats *et al.*, 2000). Most variability is found among macrolides and tetracycline resistances, and the monitoring and the susceptibility of these two groups of antimicrobials are an issue of interest in public health (Ge *et al.*, 2013).

For zoonotic bacteria it is of importance both to study the antimicrobial resistances as well as the resistance determinants and their genetic composition. This might be very useful to prevent the spread of resistance and for understanding the relationships in antibiotic resistance between bacterial populations (Wirz *et al.*, 2010). In *Campylobacter* spp., it is well known that mutations affecting the quinolone resistance-determining region (QRDR) of the *gyrA* gene are responsible for quinolone resistance (Piddock *et al.*, 2003). Among the described mutations, Thr86Ile is the most prevalent (Bachoual *et al.*, 2001), conferring high minimum inhibitory concentration (MIC) values. In addition to this mutation, several other point mutations at *gyrA* have been described at the same codon—Thr86Val (Piddock *et al.*, 2003), Thr86Lys and Thr86Ala (Wang *et al.*, 1993)—as well as in other codons: Ala87Pro, Asp90His, and Asp90Tyr. These other mutations confer resistance against quinolones with different MICs values. Polymorphisms in the *gyrB* gene have been disregarded as the cause of

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +34 913380989. Fax: +34 915097913. E-mail: dperez@externos.msssi.es

(Received 19 November 2013; accepted 30 January 2014)

© 2014 Houghton Trust Ltd

resistance to quinolones in *Campylobacter* spp. (Payot *et al.*, 2006). Other mechanisms such as *qnr* or *aac(6')*-Ib-cr genes have not been described in *Campylobacter* spp.

There are two main mechanisms conferring resistance against macrolides in *Campylobacter* spp. The most prevalent are the mutations at positions 2074 and 2075 (domain V) in the *rrn* gene, which encodes for 23S rRNA (Gibreel *et al.*, 2005). Transversion A2075G is the most commonly found, in most cases, in homozygosity where the three copies of *rrn* gene possess the mutation (Gibreel *et al.*, 2005). This mutation is responsible for the high MIC values against macrolides. Other described mechanisms are the mutations in *rplD* and *rplV* genes, which encode for L4 and L22 ribosomal proteins, respectively. Only the mutations in these genes affecting the regions comprising amino acids 55 to 77 in L4 and 109 to 142 in L22 have been associated with macrolide resistance (Caldwell *et al.*, 2008).

Among the different known mechanisms of tetracycline resistance, protection of the ribosomal site of 16S rRNA mediated by the TetO protein is the most important in *C. jejuni* and *C. coli* (Pratt & Korolik, 2005). This protein is coded by the *tetO* gene and can be located on the chromosome and plasmids (Avrain *et al.*, 2004). The presence of conjugative plasmids containing *tetO* gene is likely to play a substantial role in dissemination of the resistance (Wieczorek & Osek, 2013).

In a previous study (Pérez-Boto *et al.*, 2013), we monitored the antimicrobial resistance of 697 *C. jejuni* and 108 *C. coli* isolates recovered from poultry in two early stages of broiler production in Spain. Both grandparent breeder broiler farms (GPBF) and the parent breeder broiler farms (PBF) were monitored during a 4-year period (2002 to 2005). The total percentages of resistance were 74.9%, 73.9%, 48.2%, 19.8% and 3.1%, respectively for nalidixic acid, ciprofloxacin, tetracycline, amoxicillin and erythromycin, and 10.3% were pan-susceptible. With these previous data, the objective of our study was to characterize the mechanisms of quinolone, macrolide, and tetracycline resistance among the avian *Campylobacter* isolates obtained in two early stages of broiler production in Spain.

Materials and Methods

Origin of campylobacter isolates and MIC determination. *Campylobacter* isolates representing the different resistotypes that had been determined in the previous study by the disk-diffusion method (Pérez-Boto *et al.*, 2013) were chosen for investigation of mechanisms of resistance to quinolones, macrolides and tetracycline (Table 1).

One isolate of each resistotype found in each flock was selected for MIC determination. When the same resistotype in a flock could be detected, one isolate per species of *C. jejuni* and *C. coli*, respectively was chosen. In total, 51 isolates of *C. jejuni* and 10 of *C. coli* were selected for MIC determination.

In the selected isolates, MICs were investigated by the E-test method (AB Biodisk, Solna, Sweden) according to the manufacturer's instructions. We followed the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines and recommendations for testing the isolates. The MIC values were compared with cut-off values provided by the CLSI (2010) to ensure the resistance profile of the strains. Mueller–Hinton agar supplemented with 5% defibrinated sheep blood (Becton & Dickinson, Madrid, Spain) was used as culture medium in all the susceptibility tests.

Typing of isolates. Two different subtyping methods were carried out for comparison purposes between the isolates and for the characterization of populations within a flock. Restriction fragment length polymorphism-polymerase chain reaction (RFLP-PCR) of the *flaA* gene was performed following a previously published protocol (Nachamkin *et al.*, 1993) using *DdeI* as restriction enzyme (FastDigest®; Fermentas Thermo Fisher,

Madrid, Spain). Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) using *KpnI* (Takara Bio Inc., Madrid, Spain) was carried out following the conditions described previously (On *et al.*, 1998), including an initial time of 4 sec and a final time pulse of 20 sec for 22 h in 0.9% w/v agarose (Seakem Gold; Lonza, Madrid, Spain) in 0.5× TBE buffer.

Comparison of restriction profiles was performed using Infoquest Software (BioRad, Madrid, Spain) by employing the Dice index algorithm with an optimization and tolerance of 1%. Dendrograms were constructed using the unweighted pair group method with arithmetic mean.

Selection of resistant isolates of campylobacter. For quinolone resistance, one isolate per flock within the most frequent resistotype was selected, which resulted in 22 *C. jejuni* and four *C. coli* isolates (Table 1). This selection was made because MICs against ciprofloxacin and nalidixic acid were observed as equal among the different resistotypes and populations of *Campylobacter* isolates (populations defined by RFLP-PCR of *flaA* and PFGE).

The macrolide resistance had been detected only in a *C. coli* population from the single flock P-H (Table 1). The flock was distributed in three different sheds, and hence three isolates, one per shed, were selected for the investigation of the mechanisms of resistance.

Tetracycline-resistant isolates had been detected in all but five flocks, and in this case one isolate by resistotype was investigated (30 *C. jejuni* and nine *C. coli* isolates) (Table 2), because, unlike quinolone resistance, there were differences in the MIC for tetracycline within populations and resistotypes from the same flocks.

Isolation, amplification and sequencing of DNA. DNA templates of all strains examined in the study were obtained using InstaGene Matrix (BioRad Spain). All PCR amplifications were carried out using the Ready-to-Go system (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK), following the manufacturer's instructions.

For the investigation of quinolone resistance, a region of 1081 base pairs (bp) from the *gyrA* gene including the QRDR region (210 bp) was amplified using the primers GyrAF1 (5'-CAACTGGTCTAGCCTTTTG-3') and GyrAR1 (5'-AATTTCATCATAGCCTACG-3'), as described previously (Luo *et al.*, 2005). Another PCR was carried out to determine the presence of the *tetO* gene responsible for tetracycline resistance in *Campylobacter* spp. The primers tetOF (5'-GTGACATCTTTTCAGTGGGAGG-3') and tetOR (5'-CTTCCATCTGCACATTCCCC-3') designed by us were used for the detection of a region of 1014 bp of the *tetO* gene.

For the investigation of macrolide resistance, a 852-bp fragment of 23S rDNA was amplified by PCR in each resistant isolate using the pair of primers 23Suniv+41783 (5'-GCTCGAAGGTTAATTGATG-3') and 23Suniv-42635 (5'-GCTCTTGGCAGAACAC-3') as described previously (Pérez-Boto *et al.*, 2010). In addition to this, ribosomal genes *rplD* and *rplV* were amplified due to their role in macrolide resistance using the primers and PCR conditions presented earlier (Cagliero *et al.*, 2006).

For sequencing, the PCR products were purified using the GFX PCR DNA and the Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences) following the manufacturer's instructions. The sequences were obtained with ABI PRISM 377 equipment (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA, USA) using Big Dye Ready Reaction Mix version 3.1 (Applied Biosystems), following the manufacturer's protocol.

The sequences were assembled using Lasergene Seqman II software (DNA Star Inc., Madison, WI, USA) and the amino acid sequences were investigated using the CLUSTAL W routine of MegAlign software (v. 6.1; DNA Star, Inc.).

Plasmid isolation and detection of the *tetO* gene. Plasmids from isolates of *Campylobacter* spp. resistant to tetracycline were obtained from bacteria cultivated on Columbia agar supplemented with 5% sheep blood. Plasmid extraction was carried out using the GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas Thermo Fisher). *Escherichia coli* strain V517 was used as a positive control for plasmid extraction and the molecular weight ladder. The presence and size of the plasmids in the eluted purified liquid obtained with the commercial kit were checked by 1.2% agarose gel electrophoresis (MS8 agarose; Conda, Madrid, Spain). Determination of molecular weights of the plasmids from *Campylobacter* isolates was carried out with Quantity One software (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA).

Table 1. Origin of *Campylobacter* isolates, species relationships and resistotypes with respect to stage of production.

Production stage ^a	Farm	Flock	Sampling year	Number of birds/farm	Age of selected birds (weeks)	Species	Resistotypes ^b
GPBF	1	A	2002/2003	14,000	28	<i>C. jejuni</i>	NZA, NZAT, NZT ^c , T, PanS
		B	2003	14,000	25	<i>C. jejuni</i>	T
		C	2004	14,000	26	<i>C. jejuni</i>	NZT ^c , T
	2	D	2002	14,000	43	<i>C. jejuni</i>	NZ ^c , NZA, T, PanS
		E	2002/2003	14,000	21	<i>C. jejuni</i>	NZAT ^c
		F	2003/2004	14,000	37	<i>C. jejuni</i>	NZT ^c
	3	G	2002	16,000	57	<i>C. jejuni</i>	NZ ^c
		H	2002/2003	16,000	23	<i>C. jejuni</i>	NZ ^c , NZA
		I	2003/2004	16,000	27	<i>C. jejuni</i>	T
	4	J	2005	16,000	30	<i>C. jejuni</i>	NZT ^c
		L	2002/2003	16,000	23	<i>C. jejuni</i>	NZ ^c , PanS
		M	2003	16,000	18	<i>C. jejuni/C. coli</i>	T, NZT, NZAT ^c
	5	N	2004	16,000	23	<i>C. jejuni</i>	NZT ^c , T
		O	2002	16,000	57	<i>C. jejuni</i>	NZ ^c , NZA, PanS
		P	2002/2003	16,000	23	<i>C. jejuni</i>	NZ ^c , NZT
		Q	2003	16,000	13	<i>C. jejuni/C. coli</i>	NZ ^c , NZA, T
		R	2004	16,000	20	<i>C. jejuni</i>	NZT, NZAT ^c
PBF	P1	P-A	2003	8300	16	<i>C. jejuni</i>	NZAT ^c
	P2	P-B	2003	11,600	16	<i>C. jejuni</i>	NZ, NZA ^c , NZAT
	P3	P-C	2003	16,500	17	<i>C. jejuni/C. coli</i>	NZT, NZAT ^c
	P4	P-D	2003	8800	11	<i>C. jejuni</i>	NZT ^c , NZAT
	P5	P-E	2003	16,000	14	<i>C. jejuni</i>	NZ, NZT, NZAT ^c
	P6	P-F	2003	16,000	25	<i>C. jejuni/C. coli</i>	NZ ^c , NZT, NZAT
	P7	P-G	2003	12,000	10	<i>C. jejuni/C. coli</i>	NZA ^c , NZAT
	P8	P-H	2003	12,000	5	<i>C. coli</i>	NZET ^{c,d}
	P9	P-I	2003	20,000	26	<i>C. jejuni/C. coli</i>	NZT, NZAT ^c
	P10	P-J	2003	20,000	12	<i>C. jejuni</i>	PanS
	P12	P-L	2004	8000	9	<i>C. jejuni/C. coli</i>	T, NZT ^c , NZAT
	P13	P-M	2004	16,000	18	<i>C. jejuni</i>	NZT ^c

^aBroiler GPBF and PBF.^bN, nalidixic acid; Z, ciprofloxacin; A, amoxicillin; E, erythromycin; T, tetracycline; PanS, pan-susceptible (e.g. NZT is resistant to nalidixic acid, ciprofloxacin and tetracycline).^cResistotypes in which the mechanisms of quinolone resistance were investigated. For the tetracycline resistance, one isolate by resistotype was investigated.^dOnly one population of *C. coli* resistant to erythromycin.

The location of *tetO* was investigated using Southern blot experiments. A *tetO* probe was generated and labelled with digoxigenin-11-dUTP by PCR (DIG probe synthesis kit; Roche Applied Science, Barcelona, Spain) using the same pair of primers that was used in PCR for *tetO* amplification. As a template, all of the DNA templates from the tetracycline-resistant isolates of our study were mixed and used in the labelling of the probe. Another probe, labelled with digoxigenin-11-dUTP, was constructed using hexanucleotide random primers and V517 *E. coli* plasmid as a template for PCR. It was used to detect the molecular marker used in plasmid gel electrophoresis.

The plasmids were transferred into positively charged nylon membranes (Roche Applied Science, Madrid, Spain) overnight, and fixed to the membrane using ultraviolet light exposure. In the tetracycline-resistant strains, in which no plasmids were isolated, DNA from *KpnI*-PFGE gels was also transferred to nylon membranes. The membranes were washed twice for 10 min in 2× SSC and 0.1% SDS at 65°C and once for 15 min in 1× SSC and 0.1% SDS at 65°C. The *tetO* probes were immunodetected with anti-digoxigenin-AP and Fab fragments (Roche Applied Sciences, Barcelona, Spain) and then visualized by colorimetric detection using NBT/BCIP (Roche Applied Sciences, Barcelona, Spain).

Conjugation experiments. Conjugation experiments were carried out as described by Schmidt-Ott *et al.* (2005) with the modification that erythromycin was used as the antimicrobial selected by recipient strains instead of nalidixic acid. As recipient strains, two erythromycin-resistant *C. jejuni* strains of clinical origin were selected and named as Rec1 and Rec2 (Table 2). In these strains, a substitution A2075G in the three alleles of 23S

rDNA was responsible for the macrolide resistance. Erythromycin resistance was chosen due to their chromosomal resistance location, thereby avoiding transfer of this resistance from recipient strains to donor strains by plasmid conjugation. Furthermore, the recipient strains were confirmed plasmid free.

Four *C. jejuni* tetracycline-resistant strains containing plasmids were selected as donors in the conjugation experiment (Table 2). They varied in their MIC value against tetracycline (32 mg/l, 96 mg/l, and two isolates with >256 mg/l). Muller-Hinton agar with 5% sheep blood, supplemented with tetracycline (50 mg/l) and erythromycin (50 mg/l), was used to select the possible transconjugants. The transconjugant colonies were selected and analysed for the MIC for tetracycline, *tetO* sequence analysis, and PCR-RFLP of *flaA*, to verify the profile of the recipient strains and their resistance to tetracycline.

Sequence data. All of the DNA sequences described in this study have been deposited in the GenBank database with the accession numbers KF845970 to KF846002 for *gyrA* and KF845959 to KF845968 for *tetO*, and the 23S rDNA sequence from erythromycin-resistant population with the accession number KF845969.

Results

Quinolone resistance. As shown in Table 1, only three out of 29 flocks (flocks B, I, and P-J) were colonized by campylobacter isolates susceptible to quinolones. In all of the investigated resistant isolates, the MICs against nalidixic

Table 2. Mechanisms of tetracycline resistance in *Campylobacter* isolates with indication of location of *tetO* investigated by Southern blotting, MICs, sizes of isolated plasmids and recipient strains (Rec1 and Rec2) in mating experiments.

Production stage ^a	Farm	Flock	Sampling year	Number of isolates tested	Resistotype	Species	MIC tetracycline (mg/l)	Plasmid sizes (kb)	<i>tetO</i> location
GPBF	1	A	2002/2003	74	NZT	<i>C. jejuni</i>	96	–	CR
					NZAT	<i>C. jejuni</i>	64	–	CR
					T	<i>C. jejuni</i>	>256	62.8	62.8 kb p
		B	2003	16	T	<i>C. jejuni</i>	96	–	CR
	2	D	2002	60	NZT ^b ;	<i>C. jejuni</i>	32	60	60 kb p
					T	<i>C. jejuni</i>	48	–	CR
					T	<i>C. jejuni</i>	48	65.6	65.6 kb p
		E	2002/2003	15	NZAT	<i>C. jejuni</i>	64	–	CR
	3	F	2003/2004	8	NZT	<i>C. jejuni</i>	64	–	CR
					T	<i>C. jejuni</i>	64	56.9	56.9 kb p
					T	<i>C. jejuni</i>	>256	66.2	66.2 kb p
		J	2005	27	NZT	<i>C. jejuni</i>	64	–	CR
	4	M	2003	60	T	<i>C. jejuni</i>	64	–	CR
					NZAT	<i>C. jejuni</i>	64	–	CR
					T	<i>C. coli</i>	>256	–	CR
					NZT	<i>C. coli</i>	>256	–	CR
	5	N	2004	12	NZT	<i>C. jejuni</i>	32	–	CR
					T	<i>C. jejuni</i>	64	68	68 kb p
		P	2002/2003	74	NZT	<i>C. jejuni</i>	64	–	CR
		Q	2003	27	T	<i>C. coli</i>	128	–	CR
PBF	P1	P-A	2003	9	NZT	<i>C. jejuni</i>	48	54.9	54.9 kb p
					NZAT	<i>C. jejuni</i>	64	–	CR
					NZAT	<i>C. coli</i>	>256	–	CR
	P2	P-B	2003	18	NZT	<i>C. jejuni</i>	48	48.3, 60	60 kb p
					NZAT	<i>C. coli</i>	>256	5.3, 36.1	36.1 kb p
					NZT	<i>C. jejuni</i>	>256	60.2	60.2 kb p
	P3	P-C	2003	28	NZAT	<i>C. jejuni</i>	>256	32.6	32.6 kb p
					NZAT	<i>C. coli</i>	96	35.4, 78.3	35.4 kb p
					NZAT ^b ;	<i>C. jejuni</i>	>256	55.2	55.2 kb p
	P4	P-D	2003	19	NZT	<i>C. jejuni</i>	16	64	64 kb p
					NZAT	<i>C. coli</i>	96	–	CR
					NZAT ^b ;	<i>C. coli</i>	96	3.3, 5.3, 6.6, 59.4	3.3 kb p
	P5	P-E	2003	10	NZAT	<i>C. jejuni</i>	96	–	CR
					NZAT	<i>C. coli</i>	64	66.9	66.9 kb p
					NZT	<i>C. coli</i>	256	6.7, 24.2, 60.5	CR
	P6	P-F	2003	23	NZAT	<i>C. jejuni</i>	48	–	CR
					NZAT	<i>C. coli</i>	128	–	CR
					NZT	<i>C. coli</i>	>256	4.2, 5.4, 19.9, 58	58 kb p
Recipient strains	Rec1	Rec2	2004	–	NZAT	<i>C. coli</i>	16	13.4	CR
					NZT	<i>C. coli</i>	24	–	CR
					NZT	<i>C. coli</i>	24	–	CR
					NZT	<i>C. coli</i>	24	–	CR
					NZT	<i>C. coli</i>	24	–	CR
					NZT	<i>C. coli</i>	24	–	CR

CR, chromosome; p, plasmid; N, nalidixic acid; Z, ciprofloxacin; A, amoxicillin; E, erythromycin; T, tetracycline.

^aBroiler GPBF and PBF.^bStrains selected for mating experiments as donors.

acid were >256 mg/l, while those against ciprofloxacin were >32 mg/l, with the exception of isolates from flocks F and P–M (both with 16 mg/l), and flock P–F (12 mg/l). As previously explained, the QRDR of *gyrA* gene was sequenced in one isolate from a resistant flock, which showed, in all cases, the mutation Thr86Ile. Moreover, high homology among the amino acid sequences was found independent of the flock, stage of production, or even subtype of the strains (data not shown). One isolate, from flock P–C, possessed an additional mutation (Pro104Ser) in

QRDR, with MICs of >256 mg/l and >32 mg/l for nalidixic acid and ciprofloxacin, respectively (the highest values in E-test strips).

Macrolide resistance. The mechanisms of macrolide resistance were investigated in the only macrolide-resistant population of *C. coli* isolated from flock P–H. They formed a single population as evidenced by subtyping methods (RFLP-PCR of *flaA* and *KpnI*-PFGE; data not shown). As

explained previously, three isolates within the flock were chosen, all them with MIC >256 mg/l against erythromycin.

In these isolates, mutation A2075G was present and the electropherogram of the 23S rDNA sequence showed a single peak of guanidine at position 2075, which suggested that the three copies of the gene were mutated. None of the known mutations in *rpI/D* and *rpI/V* responsible for macrolide resistance were found in any of the investigated isolates.

Tetracycline resistance. Tetracycline resistance showed a variety of MICs in the isolates of the study (from 16 to >256 mg/l) independent of the production stage, species of *Campylobacter*, or location of *tetO* gene (Table 2). A fragment of *tetO* was detected by Southern blot only in plasmids from isolates from eight flocks (three GPBF and five PBF) and apparently only in the chromosome of isolates from 10 flocks (six GPBF and four PBF); on the other hand, in six flocks (four GPBF and two PBF), there were isolates in which *tetO* appeared in both locations. For this group with two locations, a comparison of the *KpnI*-PFGE profiles of tetracycline resistant isolates was carried out. As shown in Figure 1, the maximum similarity between isolates within a flock with different *tetO* location was 62%, between isolates of flock P-L.

Regarding the isolation of plasmids, the sizes varied between 3.3 and 78.3 kb, but most of them were around 60 kb.

With regard to the conjugation experiments, Rec1 was able to acquire resistance to tetracycline through the plasmids from the isolates of flocks P-C and P-G. The recipient strain Rec2 acquired the plasmid from isolates of flocks C, P-C, P-E, and P-G. MICs of transconjugants were calculated and values of 16 mg/l for flock P-C (Rec-1), 16 mg/l for flock P-G (Rec-1), 32 mg/l for flock C (Rec-2), 16 mg/l for flock P-C (Rec-2), 32 mg/l for flock P-E (Rec-2), and 48 mg/l for flock P-G (Rec-2) were obtained.

The RFLP-PCR of *flaA* of transconjugants was carried out, which showed the same restriction pattern as that of the recipient strains (Figure 2).

Discussion

The objective of this study was to describe the molecular mechanisms responsible for antimicrobial resistance in *C. jejuni* and *C. coli* isolated from two early stages of poultry production in Spain sampled during a 4-year period. During that time, resistance against nalidixic acid, ciprofloxacin, erythromycin, tetracycline and amoxicillin was found.

With regard to the quinolones, mutation Thr86Ile was found in all of the quinolone-resistant isolates analysed, even when they were of different species or subtypes. These data are consistent with published data (Piddock *et al.*, 2003; Luo *et al.*, 2005). This mutation is the most prevalent in clinical and veterinary isolates, among other described mutations (Thr86Ala, Thr86Lys, Ala87Pro, Asp90His, Asp90Tyr, etc.) (Wang *et al.*, 1993; Bachoual *et al.*, 2001; Piddock *et al.*, 2003) mostly of *in vitro* origin (Bachoual *et al.*, 2001). One isolate possessed another mutation in QRDR, Pro104Ser, previously described in isolates of animal and human origin (Piddock *et al.*, 2003; Jesse *et al.*, 2006). Pro104Ser has always been detected together with Thr86Ile, and its function in resistance is not known and more studies are necessary to ascertain its role.

Very high MIC values were found in all isolates, showing that Thr86Ile, as described previously (Piddock *et al.*, 2003; Alfredson & Korolik, 2007), provides by itself high resistance to quinolones.

Macrolide resistance in *Campylobacter* spp. has been linked mostly with *C. coli* isolates of swine origin. Poultry isolates seem to be more susceptible to this family of antimicrobials, because macrolides are not commonly used in antibiotic treatment of broilers as in swine (Belanger & Shryock, 2007). In our study, only a population of *C. coli* from a PBF was resistant to this antimicrobial. The mechanism of resistance described in this population was the mutation A2075G in *rrn* gene, which is the most prevalent in *Campylobacter* spp., providing a high MIC value. It has been shown that at least two out of the three copies of *rrn* gene have to be mutated to show high MIC values (Gibreel *et al.*, 2005). Our isolates seem to have been mutated in all three copies resulting in the high MIC values observed (>256 mg/l).

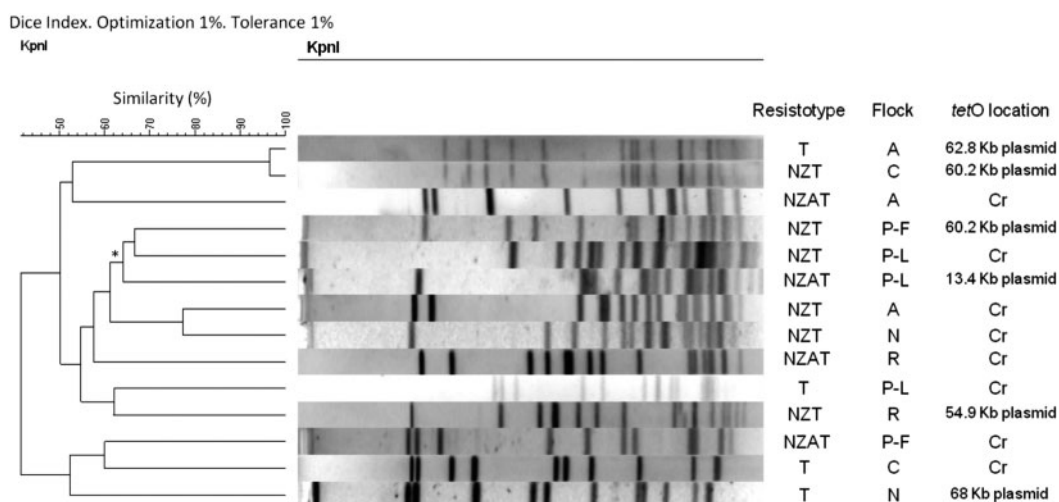


Figure 1. Comparison of the *KpnI*-PFGE profiles of isolates from flocks in which *tetO* was located both on the chromosome and on the plasmid. The comparison was carried out with Dice index and the tolerance and optimization values of 1%. Dendrogram constructed with unweighted pair-group arithmetic average clustering. Each population is defined by their PFGE profile. The highest similarity between populations within a flock (P-L) is marked with an asterisk (62%).

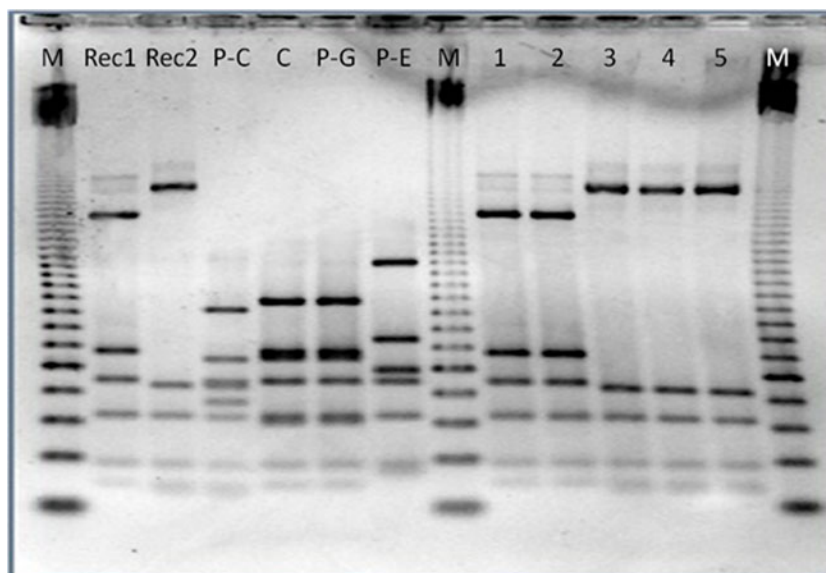


Figure 2. RFLP-PCR of *flaA* from the recipient, donor, and transconjugant isolates. M, molecular marker (50-bp ladder; Ge Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK). Rec1 and Rec2 are recipient isolates. P-C, C, P-G, and P-E are donor isolates; lanes 1 to 5 represent the transconjugants P-C (Rec1), P-G (Rec1), C (Rec2), P-E (Rec2) and P-G (Rec2), respectively.

Regarding tetracycline resistance, lack of association has been described between the polymorphisms along the sequence of *tetO* and the chromosomal or plasmid location of this gene with MIC values (Pratt & Korolik, 2005; Piddock *et al.*, 2008). In our study, we also found an apparent lack of association between the location of *tetO* (chromosome or plasmid) and the MIC value. Furthermore, on a flock level, different populations of *Campylobacter* spp., either with *tetO* located in the plasmid or chromosome, could coexist. Within the same population of *Campylobacter* defined by comparison of PFGE profiles, the same location of *tetO* in both the plasmid and the chromosome was never found. The chromosomal location of *tetO* may represent mobilization and integration of part of the resistance plasmid in the chromosome after conjugation between isolates from different populations within the same flock.

Recombination and integration of tetracycline resistance plasmids have been documented previously in *Campylobacter* spp. (Pratt & Korolik, 2005). As previously demonstrated, plasmids with tetracycline resistance genes are very conserved, with high homology in size and sequence (Ge *et al.*, 2013). Most of the tetracycline resistance plasmids reported in different studies are 30 to 58 kb in size (Pratt & Korolik, 2005; Alfredson & Korolik, 2007). In our study, we noted plasmids between 3.3 and 78.3 kb, but the *tetO* gene conferring resistance against tetracycline could be found in plasmids of around 60 kb. This observation indicates the observed conservative nature of the tetracycline resistance plasmids.

Conjugation of tetracycline resistance plasmids was demonstrated by transmission of the resistance against this antimicrobial, although the MICs for transconjugants were less than for the original strains. Therefore, the transmission of tetracycline resistance among the populations of *Campylobacter* spp. in the farms from our study is plausible.

Our results confirm the high prevalence of mutation Thr86Ile in the *gyrA* gene among quinolone-resistant isolates (without previous quinolone treatment) of poultry origin. This might indicate, as suggested previously, an advantage in colonization and persistence provided by that mutation in the absence of antimicrobial treatment. In

contrast, macrolide resistance is of low occurrence and is acquired by mutation at 23S rDNA, a mechanism commonly found in *Campylobacter* spp. Tetracycline resistance located in conjugative plasmids might be a risk factor in disseminating resistance among other *Campylobacter* populations of avian origin or even among other species commonly found in avian gut.

Acknowledgements

The authors thank the Genomic Unit from the “Centro Nacional de Microbiología” for conducting the sequencing reactions in the study. They also thank Mathieu Bangert for his critical review of the manuscript. This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III [Grant MPY-1179/02].

References

- Alfredson, D.A. & Korolik, V. (2007). Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 277, 123–132.
- Avrain, L., Vernozy-Rozand, C. & Kempf, I. (2004). Evidence for natural horizontal transfer of *tetO* gene between *Campylobacter jejuni* strains in chickens. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 134–140.
- Bachoual, R., Ouabdesslam, S., Mory, F., Lascols, C., Soussy, C.-J. & Tankovic, J. (2001). Single or double mutational alterations of *gyrA* associated with fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Microbial Drug Resistance*, 7, 257–261.
- Belanger, A.E. & Shryock, T.R. (2007). Macrolide-resistant *Campylobacter*: the meat of the matter. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60, 715–723.
- Cagliero, C., Mouline, C., Cloeckert, A. & Payot, S. (2006). Synergy between efflux pump CmeABC and modifications in ribosomal proteins L4 and L22 in conferring macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 50, 3893–3896.
- Caldwell, D.B., Wang, Y. & Lin, J. (2008). Development, stability, and molecular mechanisms of macrolide resistance in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 52, 3947–3954.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2010). *Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; Approved guideline-Second Edition*. CLSI Document

- M45-A2 Vol. 30 No. 18. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- EFSA & ECDC (2013). The European union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. *EFSA Journal*, 11, 3129. Retrieved from <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3129.pdf>
- Ge, B., Wang, F., Sjolund-Karlsson, M. & McDermott, P.F. (2013). Antimicrobial resistance in *Campylobacter*: susceptibility testing methods and resistance trends. *Journal of Microbiological Methods*, 95, 57–67.
- Gibreel, A., Kos, V.N., Keelan, M., Trieber, C.A., Levesque, S., Michaud, S. & Taylor, D. E. (2005). Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: molecular mechanism and stability of the resistance phenotype. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 49, 2753–2759.
- Jesse, T.W., Englen, M.D., Pittenger-Alley, L.G. & Fedorka-Cray, P.J. (2006). Two distinct mutations in *gyrA* lead to ciprofloxacin and nalidixic acid resistance in *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolated from chickens and beef cattle. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 682–688.
- Lee, M.D. & Newell, D.G. (2006). *Campylobacter* in poultry: filling an ecological niche. *Avian Diseases*, 50, 1–9.
- Luo, N., Pereira, S., Sahin, O., Lin, J., Huang, S., Michel, L. & Zhang, Q. (2005). Enhanced in vivo fitness of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter jejuni* in the absence of antibiotic selection pressure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 102, 541–546.
- Moore, J.E., Barton, M.D., Blair, I.S., Corcoran, D., Dooley, J.S.G., Fanning, S., Kempf, I., Lastovica, A.J., Lowery, C.J., Matsuda, M., McDowell, D.A., McMahon, A., Millar, B.C., Rao, J.R., Rooney, P.J., Seal, B.S., Snelling, W. J. & Tolba, O. (2006). The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. *Microbes & Infection*, 8, 1955–1966.
- Nachamkin, I., Bohachick, K. & Patton, C.M. (1993). Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 1531–1536.
- On, S.L. (2013). Isolation, identification and subtyping of *Campylobacter*: where to from here? *Journal Microbiological Methods*, 95, 3–7.
- On, S.L., Nielsen, E.M., Engberg, J. & Madsen, M. (1998). Validity of *Sma*I-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by *Sal* I, *Kpn*I, and *Bam* HI polymorphisms: evidence of identical clones infecting humans, poultry, and cattle. *Epidemiology & Infection*, 120, 231–237.
- Payot, S., Bolla, J.-M., Corcoran, D., Fanning, S., Mégraud, F. & Zhang, Q. (2006). Mechanisms of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter* spp. *Microbes & Infection*, 8, 1967–1971.
- Pérez-Boto, D., Lopez-Portoles, J.A., Simon, C., Valdezate, S. & Echeita, M.A. (2010). Study of the molecular mechanisms involved in high-level macrolide resistance of Spanish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65, 2083–2088.
- Pérez-Boto, D., García-Peña, F.J., Abad-Moreno, J.C. & Echeita, M.A. (2013). Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated from two early stages of poultry production. *Microbial Drug Resistance*, 19, 323–330.
- Piddock, L.J., Ricci, V., Pumbwe, L., Everett, M.J. & Griggs, D.J. (2003). Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter* species from man and animals: detection of mutations in topoisomerase genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, 19–26.
- Piddock, L.J.V., Griggs, D., Johnson, M.M., Ricci, V., Elviss, N.C., Williams, L.K., Jorgensen, F., Chisholm, S.A., Lawson, A.J., Swift, C., Humphrey, T.J. & Owen, R.J. (2008). Persistence of *Campylobacter* species, strain types, antibiotic resistance and mechanisms of tetracycline resistance in poultry flocks treated with chlortetracycline. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62, 303–315.
- Prats, G., Mirelis, B., Llovet, T., Munoz, C., Miro, E. & Navarro, F. (2000). Antibiotic resistance trends in enteropathogenic bacteria isolated in 1985–1987 and 1995–1998 in Barcelona. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 44, 1140–1145.
- Pratt, A. & Korolik, V. (2005). Tetracycline resistance of Australian *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55, 452–460.
- Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.-A., Roy, S.L., Jones, J.L. & Griffin, P.M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17, 7–15.
- Schmidt-Ott, R., Pohl, S., Burghard, S., Weig, M. & Groß, U. (2005). Identification and characterization of a major subgroup of conjugative *Campylobacter jejuni* plasmids. *Journal of Infection*, 50, 12–21.
- Toljander, J., Dovarn, A., Andersson, Y., Ivarsson, S. & Lindqvist, R. (2012). Public health burden due to infections by verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *Campylobacter* spp. as estimated by cost of illness and different approaches to model disability-adjusted life years. *Scandinavian Journal of Public Health*, 40, 294–302.
- Wang, Y., Huang, W.M. & Taylor, D.E. (1993). Cloning and nucleotide sequence of the *Campylobacter jejuni gyrA* gene and characterization of quinolone resistance mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37, 457–463.
- Whiley, H., van den Akker, B., Giglio, S. & Benthall, R. (2013). The role of environmental reservoirs in human campylobacteriosis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10, 5886–5907.
- Wieczorek, K. & Osek, J. (2013). Antimicrobial resistance mechanisms among *Campylobacter*. *BioMed Research International*, 2013, 340605.
- Wirz, S.E., Overesch, G., Kuhnert, P. & Korczak, B.M. (2010). Genotype and antibiotic resistance analyses of *Campylobacter* isolates from ceca and carcasses of slaughtered broiler flocks. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 6377–6386.

Capítulo II

Artículo 6

“Study of the molecular mechanisms involved in high-level macrolide resistance of Spanish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains”

“Estudio de los mecanismos moleculares implicados en la resistencia a alto nivel frente a macrólidos en cepas españolas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*”

Resumen del artículo:

Objetivos: El objetivo de este estudio fue analizar los mecanismos de resistencia frente a macrólidos (antibiótico de elección en campilobacteriosis severas) en cepas de *Campylobacter jejuni* y *C. coli* aisladas a partir de pacientes ingresados por campilobacteriosis en diferentes hospitales españoles a lo largo de los años 2006 y 2007. Los mecanismos estudiados fueron los polimorfismos en el gen ADN_r 23S, en los genes que codifican las proteínas ribosómicas L4 y L22 (*rpID* y *rpIV*, respectivamente), y en la zona de regulación del operón *cmeABC* que codifica para la bomba de eflujo CmeABC.

Métodos: Durante los años 2006 y 2007 en el Laboratorio de *Campylobacter* del Centro Nacional de Microbiología se recibieron 797 cepas de *Campylobacter* spp. procedentes de 10 hospitales españoles. De forma rutinaria las cepas recibidas se identifican a nivel de especie y se estudia su sensibilidad a diferentes grupos de antimicrobianos entre otras investigaciones. Los ensayos de sensibilidad a antimicrobianos se realizan mediante tiras E-test siguiendo las especificaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) y los valores de CMI obtenidos se comparan con los proporcionados por el CLSI (en el caso de los macrólidos) para decidir si la cepa es resistente o sensible. La investigación de la resistencia a macrólidos se llevó a cabo mediante la secuenciación de un fragmento del gen 23S ARN_r amplificado previamente con una PCR diseñada por nosotros con este motivo y con la secuenciación de los genes ribosómicos *rpID* y *rpIV*. La zona regulatoria del operón *cmeABC* fue amplificada y secuenciada usando una PCR previamente descrita y en las cepas en las que no hubo amplificación mediante otra PCR diseñada por nosotros.

Resultados: De las 797 cepas de *Campylobacter* spp. recibidas en 2006 y 2007, 678 fueron identificadas como *C. jejuni*, y 119 como *C. coli*. Los valores de CMI obtenidos frente a la eritromicina dieron lugar a una distribución bimodal, con una gran cantidad de cepas distribuidas entre los valores 0.5-4 mg/L y un grupo de 30 cepas resistentes, todas con valores superiores a 256 mg/L. No se encontraron cepas con CMIs entre 32 y 256 mg/L.

De las 30 cepas resistentes, 28 pertenecían a la especie *C. coli*, siendo las dos restante *C. jejuni*. El porcentaje de resistentes a eritromicina en los dos años de estudio fue del 3.8%, mientras que por especies fue de un 0.3% en *C. jejuni* y un 23.5% en *C. coli*. En cuanto a los mecanismos de resistencia, se encontraron dos mutaciones diferentes en el gen ADNr 23S, previamente descritas: A2075G (28 cepas) y A2074G (2 cepas). El análisis de los genes *rpID* y *rpIV* arrojó un buen número de polimorfismos (mutaciones e incluso inserciones en el gen *rpIV*), pero no dentro de la zona descrita como de influencia en la resistencia a macrólidos. Por otra parte, la secuenciación y análisis de la zona de regulación del operón *cmeABC* dio como resultado la aparición de dos grupos de cepas con diferente longitud en cuanto a la zona reguladora (94 y 107 pb). Se describieron varias transiciones, deleciones e inserciones que teóricamente impedirían la formación de la horquilla de ADN a la que se une la proteína represora del operón y por tanto, conducir a una sobreexpresión de CmeABC.

Conclusiones: Este trabajo muestra que los valores de resistencia encontrados en las cepas de *Campylobacter* causantes de gastroenteritis en España son, en general bajos, y similares a los de otros países europeos. Es importante resaltar que la mayoría de cepas pertenecían a la especie *C. coli*, y que el porcentaje de resistencia dentro de esta especie es destacable. Es también interesante resaltar que los valores de CMI encontrados en las cepas resistentes han sido superiores a 256 mg/L que es el límite del método utilizado, es decir que la resistencia a macrólidos no parece seguir una gradación en el valor de 32 a >256 mg/L, siendo más de tipo “todo o nada”. El mecanismo de resistencia implicado ha sido principalmente la mutación A2075G en el gen 23S ARNr, que es la descrita en la literatura científica como la más abundante. No se encontró ningún polimorfismo causante de resistencia en los genes ribosómicos *rpID* y *rpIV*, mientras que se describieron diferentes mutaciones que afectarían a la regulación de la expresión de la bomba de flujo CmeABC, aunque los efectos concretos de las mutaciones en la resistencia a macrólidos u otros antimicrobianos requiere nuevos estudios.

Claves del artículo y relación con los objetivos planteados

Todas las claves de este artículo se relacionan con el objetivo 2.3: Estudio de la resistencia a macrólidos en cepas de origen humano.

1. La tasa de resistencia a macrólidos en las cepas de *Campylobacter* spp. de origen humano recibidas durante los años 2006-2007 fue del 3.8%, porcentaje similar al de resto de países europeos. Los valores de CMI observados en estas cepas fueron siempre ≥ 256 mg/L (valor más alto que se puede detectar por el método utilizado, E-test).
2. Se observó una distribución desigual en cuanto a la especie aislada, siendo la mayoría de aislados pertenecientes a la especie *Campylobacter coli* (93% frente a un 7% de *C. jejuni*).
3. De los tres mecanismos responsables de resistencia a macrólidos descritos (mutaciones en el ADNr 23S, en los genes *rpmD* y/o *rpmV* y en la regulación de la bomba de eflujo CmeABC), se encontró que las mutaciones en el ADNr 23S eran las responsables de la resistencia a macrólidos.
4. Dos mutaciones en la región V del gen ADNr 23S fueron identificadas: A2075G y A2074G, esta última de forma muy minoritaria (solamente en dos aislados), lo que concuerda con la mayoría de datos publicados.
5. Se encontraron mutaciones que teóricamente afectarían a la regulación de la expresión del operón *cmeABC*, que codifica para CmeABC, pero su papel en la resistencia de las cepas portadoras no ha sido evaluado aún.

Study of the molecular mechanisms involved in high-level macrolide resistance of Spanish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains

D. Pérez-Boto^{1*}, J. A. López-Portolés¹, C. Simón¹, S. Valdezate² and M. A. Echeita¹

¹Laboratorio de *Campylobacter*, Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain; ²Laboratorio de Taxonomía Bacteriana, Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain

*Corresponding author. Tel: +34-918223710; Fax: +34-915097966; E-mail: dpboto@isci.es

Received 27 April 2010; returned 28 May 2010; revised 18 June 2010; accepted 23 June 2010

Objectives: To investigate the molecular mechanisms involved in the high-level erythromycin resistance of clinical Spanish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains.

Methods: Overall susceptibilities of 678 *C. jejuni* and 119 *C. coli* strains, collected from 10 Spanish provinces during 2006 and 2007, were determined by Etest. In high-level erythromycin-resistant strains, molecular determinants were studied. The analysis was focused on region V of the 23S rRNA gene, the *rplD* and *rplV* ribosomal genes, and the regulatory region of the CmeABC efflux pump.

Results: The global resistance rate to erythromycin was 3.8%. Among the resistant strains, 93% were *C. coli* and 7% were *C. jejuni*. The A2075G mutation in the 23S rRNA gene was detected in all of the resistant strains except for two, which carried the A2074G mutation. None of the ribosomal *rplD* and *rplV* genes harboured the described mutations that confer resistance to macrolides. Different mutations affecting the regulatory region of the CmeABC efflux pump were also found.

Conclusions: *C. coli* strains are clearly more resistant to erythromycin than *C. jejuni*. The mutation A2075G in the 23S rRNA gene was responsible for the resistance in most of the strains; A2074G was only found in two strains. Further studies are required to ascertain the effect of mutations in the regulatory region of *cmeABC*. Our data indicate that the rate of resistance was similar to that of other European countries.

Keywords: erythromycin, 23S rRNA, *rplD*, *rplV*, CmeABC

Introduction

Campylobacter spp. is the leading cause of bacterial acute diarrhoea in humans in developed countries.¹ Most of these infections are caused by *Campylobacter jejuni*,² although *Campylobacter coli* is of increasing importance,³ as evidenced by an increased number of human cases.^{4,5} The majority of infections are acquired through handling or consuming infected meat, usually undercooked food.⁶ *Campylobacter*, as a zoonotic disease agent, is commonly found in meat animals (poultry, swine, cattle and sheep). Human campylobacteriosis does not require antimicrobial treatment, being normally self-limiting;⁷ however, antimicrobial therapy is recommended in immunocompromised patients, and cases of bacteraemia and severe and prolonged diarrhoea.^{1,8} Fluoroquinolones and macrolides are the treatment of choice for these severe cases.⁷

Although resistance rates vary among countries,^{3,9,10} fluoroquinolone resistance rates are usually so high (up to 90% in

many countries, such as Thailand or Spain^{11,12}) that fluoroquinolone use as empirical treatment should be discouraged. For that reason, erythromycin and other macrolides are the best choices in severe cases of campylobacteriosis. Resistance to macrolides has been reported, although the resistance rates differ between species. In the USA, resistance rates reportedly varied during 1997–2003, between 0.3% to 3.0% for *C. jejuni* and between 4.0% to 37.5% for *C. coli*.¹³ In other countries, the rates also vary, but, generally, human isolates are reported with a low resistance rate.^{7,9} In contrast, high rates of macrolide resistance have been reported among *Campylobacter* strains from meat animals.^{7,9,13} It is generally accepted that *C. coli* is more resistant to macrolides than *C. jejuni*.^{7,14} This is probably caused by the use of macrolides, such as tylosin, as growth promoters during previous years^{7,15} in the *C. coli* main animal host (swine).

Macrolides act by binding to the 50S ribosomal subunit of the bacteria, interfering with elongation of nascent proteins. Several

molecular mechanisms have been described as being responsible for macrolide resistance in bacteria. In *Campylobacter* spp., the most prevalent mechanism among highly resistant strains is a mutation at nucleotide 2075 of domain V of the 23S rRNA gene. This mechanism also appears in many other species, such as *Streptococcus pneumoniae*,¹⁶ *Staphylococcus aureus*,¹⁷ *Helicobacter pylori*¹⁸ and others. Another less frequently reported mechanism is the mutation of nucleotide 2074 of domain V.¹⁵ These nucleotides (positions 2074 and 2075) belong to the peptidyl transferase loop and macrolides join specifically to this position. Other mechanisms associated with macrolide resistance are mutations in the *rplD* and *rplV* genes. These genes encode the ribosomal proteins L4 and L22, which are probably involved in the conformational switches in the ribosome that occur during the translation process.^{19,20} Parts of L4 and L22 (extended loops) act along the peptide exit channel controlling the rate of translation.²¹ Mutations along those extended loops may affect the peptide synthesis. In *Campylobacter* spp. there are three mutations described for *rplD*: Gly-57→Ala/Val; and Gly-74→Ala.^{21,22} For *rplV*, an insertion of three or four amino acids at position 86 or 98 in the L22²¹ protein has been described as being responsible for macrolide resistance.

Another resistance mechanism consists of a chromosomally encoded resistance-nodulation-cell division-type efflux system,^{23,24} named the CmeABC efflux pump, which protects *Campylobacter* against bile salts, helping *Campylobacter* to colonize the animal intestinal tract.²³ It also protects against dyes, detergents and antimicrobials.²³ It is well known that changes in expression levels of CmeABC also contribute to macrolide resistance, acting in synergy with the described mutations.^{15,21,25} CmeABC is transcriptionally repressed by CmeR, which binds to an inverted repeat (IR) region between *cmeR* and *cmeA*. It has been shown that mutations in the repressing site lead to an overexpression of the efflux pump and to enhanced resistance to several antimicrobials.^{11,26}

The aim of this work was to analyse the molecular mechanisms involved in high-level macrolide resistance in *C. jejuni* and *C. coli* human strains isolated in Spain, focusing on the analysis of region V of the 23S rRNA gene, the *rplD* and *rplV* genes, and the regulatory region of the *cmeABC* operon (CmeABC efflux pump), after studying the antimicrobial susceptibilities.

Materials and methods

Bacterial strains

Seven hundred and ninety-five human *Campylobacter* spp. strains, without a known epidemiological link, from 10 Spanish provinces were received at the Campylobacter Laboratory of the Spanish National Center of Microbiology during 2006 and 2007 for identification and susceptibility testing purposes. *Campylobacter* spp. strains were grown using mCCDA (modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar; Oxoid, Madrid, Spain) medium for 48 h at 42°C. Presumptive colonies were streaked on Mueller–Hinton sheep blood agar (Becton Dickinson, Madrid, Spain) and cultured for 48 h at 42°C. DNA extraction was carried out as previously described.²⁷ Identification was performed using a previously described multiplex PCR.²⁸ When additional confirmation of the species was required, two other described multiplex PCRs were performed.^{29,30}

Antimicrobial susceptibilities

An antimicrobial susceptibility test for erythromycin was performed and MICs were determined as previously described³¹ using Etest (AB Biodisk,

Solna, Sweden). The MIC breakpoints were those defined by the CLSI: susceptible, ≤8 mg/L; intermediate, 8–32 mg/L; and resistant, ≥32 mg/L.³² *C. jejuni* strain ATCC 33560 was used as a susceptibility test control, as recommended by the CLSI.³² Strains with MICs >256 mg/L were considered to have high-level resistance to erythromycin.

Analysis of 23S rRNA, *rplD* and *rplV* genes, and the *cmeR* and *cmeABC* intergenic region

All high-level erythromycin-resistant strains were characterized for four genetic loci potentially responsible for resistance: the 23S rDNA gene; the *rplD* and *rplV* ribosomal genes; and the intergenic region between *cmeR* and *cmeABC*. The 23S rRNA gene was amplified using the primers 23SunivF+41783 (5'-GCTCGAAGGTTAATTGATG-3') and 23SunivR-42635 (5'-GCTCTTGCGAGAACAAC-3'), based on the *C. jejuni* subsp. *jejuni* 81116 sequence (GenBank accession number CP000814.1A). Amplification was carried out using the Ready-to-Go system (GE Healthcare Life Sciences, UK) with 25 cycles of 94°C for 30 s, 57°C for 20 s and 72°C for 35 s. Ribosomal genes *rplD* and *rplV* were amplified using the primers and method previously described.²¹

The regulatory region of *cmeABC* was studied by two different amplifications. The entire *cmeR* gene (950 bp), the *cmeR* and *cmeABC* intergenic region (94 bp), and the first part of *cmeA* (180 bp) were first amplified with a pair of previously described primers.¹¹ For 23 strains with negative amplification, a second PCR with new primers was designed (CmecoliF3, 5'-AATGTTTTAGCCGATACT-3'; and CmecoliR4, 5'-AACACCGCTTACTTGAGG-3') on the basis of previously sequenced bacteria (GenBank accession number FJ797670–3).³³ These primers amplified a fragment of 428 bp that included part of the *cmeR* gene (108 bp), the *cmeR* and *cmeABC* intergenic region (107 bp), and the first 213 bp of the *cmeA* gene. PCR consisted of 30 cycles of 94°C for 30 s, 52°C for 30 s and 72°C for 30 s.

PCR products were purified using Invisorb Fragment CleanUp system (Invitex, Berlin, Germany) following the manufacturer's instructions. Sequences were obtained with ABI PRISM 377 equipment (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, USA) using the BigDye Terminator protocol (Applied Biosystems). The sequences were assembled using LaserGene Seqman II software (DNA Star, Inc., Madison, WI, USA), then they were aligned and amino acids deduced using the CLUSTAL W routine of MegAlign software (v.6.1, DNA Star, Inc.). The GenBank accession numbers of all the sequences obtained in this study are presented in Table S1 [available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org/>)].

Results

Identification and antimicrobial resistance rates

Six hundred and seventy-eight (85.1%) out of 797 strains received at our laboratory were identified as *C. jejuni*, while 119 (14.9%) were *C. coli*. With the CLSI breakpoint of ≥32 mg/L, 30 strains (3.8% of the received strains) were erythromycin resistant. All of these displayed high-level resistance (MIC ≥ 256 mg/L, Etest highest level).

The distribution of high-level resistant strains by *Campylobacter* species was 93% *C. coli* and 7% *C. jejuni*. Among each species, the distribution was: *C. jejuni*, *n*=2 strains (0.3%); and *C. coli*, *n*=28 (23.5%) (as seen in Table 1). The modal MIC was 2 mg/L for *C. coli* strains (32.8%) and 1 mg/L for *C. jejuni* strains (41.3%).

23S rRNA analysis

All but two highly resistant strains had the A2075G mutation. One *C. jejuni* and one *C. coli* carried the A2074G mutation instead. In all but one of these mutant strains, it appeared

Table 1. Distribution of the erythromycin MICs for clinical *C. jejuni* (n=678) and *C. coli* (n=119) strains received from various provinces in Spain during 2006 and 2007

Year	Species	Erythromycin MICs (mg/L) ^{a,b}														
		0.016	0.032	0.064	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
2006	<i>C. jejuni</i> (n=363)	1	1	1	1	14	87	151	80	26	1	—	—	—	—	—
2007	<i>C. jejuni</i> (n=315)	—	—	2	1	9	69	129	76	25	2	—	—	—	—	2
2006	<i>C. coli</i> (n=65)	—	—	—	—	—	—	11	23	15	1	—	—	—	—	15
2007	<i>C. coli</i> (n=54)	—	—	1	—	—	4	5	16	11	4	—	—	—	—	13

^aCLSI breakpoints MICs: susceptible, ≤8 mg/L; intermediate, 8–32 mg/L; and resistant, ≥32 mg/L.³²

^bModal MIC is indicated in italics.

Table 2. 23S rRNA gene polymorphisms identified in high-level erythromycin-resistant *C. jejuni* and *C. coli* strains

Species/no. of strains	Strain ID	23S rRNA gene polymorphisms	GenBank accession no.
<i>C. coli</i> /1	CNM20060593	C2097T	GU384930
<i>C. coli</i> /1	CNM20060556	C2097T/T2113C	GU384929
<i>C. coli</i> /3	CNM20070177/CNM20070178/ CNM20070497	C2097T/G2122A/A2123G/T2198C/C2199T/C2217T/ T2221C/G2223A/C2233T/A2236G/G2239A	GU384945/GU384946/GU384954
<i>C. coli</i> /1, <i>C. jejuni</i> /1	CNM20070465/CNM20070255	T2113C	GU384953/GU384948
<i>C. coli</i> /1	CNM20060178	T2154A/A2155T/T2156A/C2162T/G2167T/T2168A/ A2169T	GU384925
<i>C. coli</i> /1	CNM20060923	G2315T/A2317G/T2331C/C2333A	GU384939
<i>C. coli</i> /1	CNM20070042	A2442T	GU384942

that the three copies of the 23S rRNA gene were mutated. In one *C. coli* strain (GenBank accession number GU384931), it seems that the A2075G mutation was present in two of the three copies of the gene, because the chromatogram showed a double peak at that position, the peak for guanine being two times higher than the peak for adenine. In addition to these, nine *C. coli* strains and one *C. jejuni* strain contained further mutations, which are summarized in Table 2. *C. coli* strains CNM20070177, CNM20070178 and CNM20070497 had the highest number of polymorphisms detected in 23 rRNA, 11 in addition to A2075G.

rplD and *rplV* analysis

For the *rplD* gene, none of the high-level erythromycin-resistant strains harboured the described mutations Gly-57→Asp/Val and Gly-74→Asp, which confer resistance to macrolides. However, 11 and 10 non-synonymous mutations were identified for the *rplD* gene and the *rplV* gene, respectively (Table 3). In addition to this, two *rplV* insertions were detected (ins119 Thr-Thr-Thr-Lys-Ala and ins124 Thr).

cmeR–*cmeA* intergenic region analysis

With the primers designed by Lin et al.,¹¹ only two *C. jejuni* and five *C. coli* gave a positive amplification of the *cmeR*–*cmeA* intergenic region (length of 94 nucleotides). The IR region was located

from –46 to –31 upstream of the *cmeA* gene (consensus sequence: TGTAATAAAAATTACA). With the newly designed pair of primers, the remaining 23 resistant strains could be analysed. The intergenic region possessed a length of 107 nucleotides instead of 94 nucleotides and the IR region was located from –50 to –35 upstream of the *cmeA* gene (consensus sequence: TGTAATAAATATTACA). Between the two intergenic regions, a similarity rate of 78.7% was determined. Polymorphisms and insertions inside of *cmeR*–*cmeA* intergenic region are represented in Figure 1.

Discussion

The frequency of macrolide resistance of Spanish *C. jejuni* and *C. coli* human clinical strains from 2006 to 2007 reported here (3.7%) is similar to frequencies previously reported in our country in earlier studies: 3.2%–7.3%;⁷ 3.2% in the period 1987–93;³⁴ and 2.3% in the period 1988–92.³⁵ In other European countries, the resistance rates are variable: 1%–3% in Finland; 3.5% in France; 7.8%–11.3% in Italy;⁷ and 11.3% in Northern Ireland⁹ (all these data refer to human isolates). As has been observed before, *C. coli* strains are more frequently macrolide resistant than *C. jejuni*; in our survey 23.5% of *C. coli* strains but only 0.3% of *C. jejuni* (two strains) had an MIC >32 mg/L, and all of these had an MIC ≥256 mg/L. It is

Table 3. L4 and L22 protein polymorphisms identified in high-level erythromycin-resistant *C. jejuni* and *C. coli* strains

Polymorphisms and insertions	No. of <i>C. coli</i> strains	No. of <i>C. jejuni</i> strains
Protein L4		
Ala-24→Thr	2	—
Thr-91→Lys	1	—
Asn-95→Ser	1	—
Val-121→Ala	7	1
Ala-140→Thr	1	—
Ile-142→Val	2	—
Val-176→Ile	3	—
Thr-177→Ser	3	—
Val-184→Ile	2	—
Met-192→Ile	6	—
Ala-196→Val	—	1
Protein L22		
Ile-65→Val	—	1
Ala-103→Val	4	—
Thr-109→Ser	—	1
Thr-109→Ala	1	1
Ala-111→Glu	1	2
Ala-114→Thr	1	2
Thr-119→Ala	—	1
Val-121→Ala	1	2
Val-130→Ala	—	2
Glu-131→Lys	—	2
ins119 Thr-Thr-Thr-Lys-Ala	1	1
ins124 Thr	1	2

noteworthy that none of the strains possessed an intermediate level of resistance to erythromycin.

With regard to the study of the molecular mechanisms among the erythromycin-resistant strains, we have focused our investigation on well-known mechanisms associated with mutations in region V of the 23S rRNA gene, the *rplD* and *rplV* genes, and the regulation region of the *cmeABC* operon. A2075G and A2074C mutations in region V of the 23S rRNA gene have been associated with high-level macrolide resistance (128–1024 mg/L),^{15,22,36} by impeding the anchorage of macrolides to the ribosome.³⁷

In our survey, the most frequent mutation detected was A2075G. This mutation, as other authors have shown,¹⁵ seems to provide some biologically advantageous features versus another mutations in 23S rRNA, such as A2074G or A2074C. Despite the biological cost of the mutations, *Campylobacter* strains carrying these mutations seem to be not only stable in culture, but to maintain their ability to colonize their host.²²

Despite the conserved nature of the 23S rRNA gene, 24 changes were found (Table 2). Most of the variations (11 out of 24) appeared in three strains. These three strains were isolated at the same hospital but at two different times. With our data, we can not be sure whether they share the same source or the epidemiological relationship between them. The fact that most of the polymorphisms were concentrated in a few strains could

be a reflection of the clonal nature of several groups of *C. coli* strains.^{38,39}

The influence of these polymorphisms in 23S rRNA in the modulation of the final erythromycin MICs for the strains is, at the moment, difficult to ascertain.

L4 and L22 are highly conserved proteins among eubacteria, due to their function in ribosomes. In *Campylobacter* spp., several mutations in L4 and L22 have been found in the loop region, leading to macrolide resistance. In our survey, no variation was found at amino acids 55–77 (loop region) of the L4 protein. Most of the changes were concentrated in the region at amino acids 91–196, except in two strains that harboured the Ala-24→Thr replacement, which is not associated with macrolide resistance.

All of the L22 protein substitutions, except Ile-65→Thr in a *C. coli* strain, were focused in the C-terminal region and outside the region between amino acids 78 and 98. Previously, none of them has been associated with macrolide resistance.³⁶ In L22, the deletions/insertions seem to be more important than substitutions.⁴⁰ The insertions ins86 Ala-Arg-Ala-Arg and ins98 Thr-Ser-His, which give resistance to macrolides, as described by Cagliero et al.,²¹ were not present in any strain. All the insertions found outside the loop region (ins119 Thr-Thr-Thr-Lys-Ala and ins124 Thr) were identified in susceptible and resistant strains.³⁶ Probably, these insertions do not affect the entry of macrolides to the ribosome. In addition, *C. coli* strains showed less polymorphism at *rplV* than *C. jejuni* strains, possibly due to the clonal nature of *C. coli*.

The transcriptional regulation of the efflux pump operon *cmeABC* is carried out by the repressor *cmeR*, which binds specifically with an IR region upstream of the *cmeA* gene. The length and sequence of this intergenic regulatory region differs between *C. jejuni* (94 bp) and *C. coli* (>107 bp). These differences in the sequence do not seem to affect the function of the repressor, as long as the sequence of the IR region (TGTAATAAAAATTACA) is maintained. In our study, five *C. coli* strains possessed an intergenic region with length and sequence typical of *C. jejuni* strains. By two additional PCRs,^{29,30} their species identification as *C. coli* was confirmed. These *C. coli* strains could be an example of genetic exchange between these two species.

To our knowledge, two confirmed mutations affecting the regulation have been described in the IR region: a deletion of one of the nucleotides between the two half-sites of the IR region;¹¹ and a C to T transition in the IR sequence. This transition has been previously associated with CmeABC overexpression, increasing the MICs of macrolides and other antimicrobials for an *in vitro* mutant strain.²⁵ As seen in Figure 1, we have found the C-36→T transition in a *C. coli* strain. To our knowledge, this is the first time that such a mutation has been described *in vivo*. Other mutations, Δ–36C and T–48→C transition, theoretically would avoid the binding of the half-sites and consequently would deregulate the expression of the *cmeABC* operon. The insertion of six nucleotides (TATTAC) inside the IR sequence theoretically does not hamper the formation of the hairpin in which CmeR binds; however, as other authors have pointed out, the two half-sites of the CmeR sequence have to be correctly spaced for the correct binding of the repressors and consequently for correct regulation of the operon.^{11,41} Therefore, a misregulation of the operon could be expected in this strain.

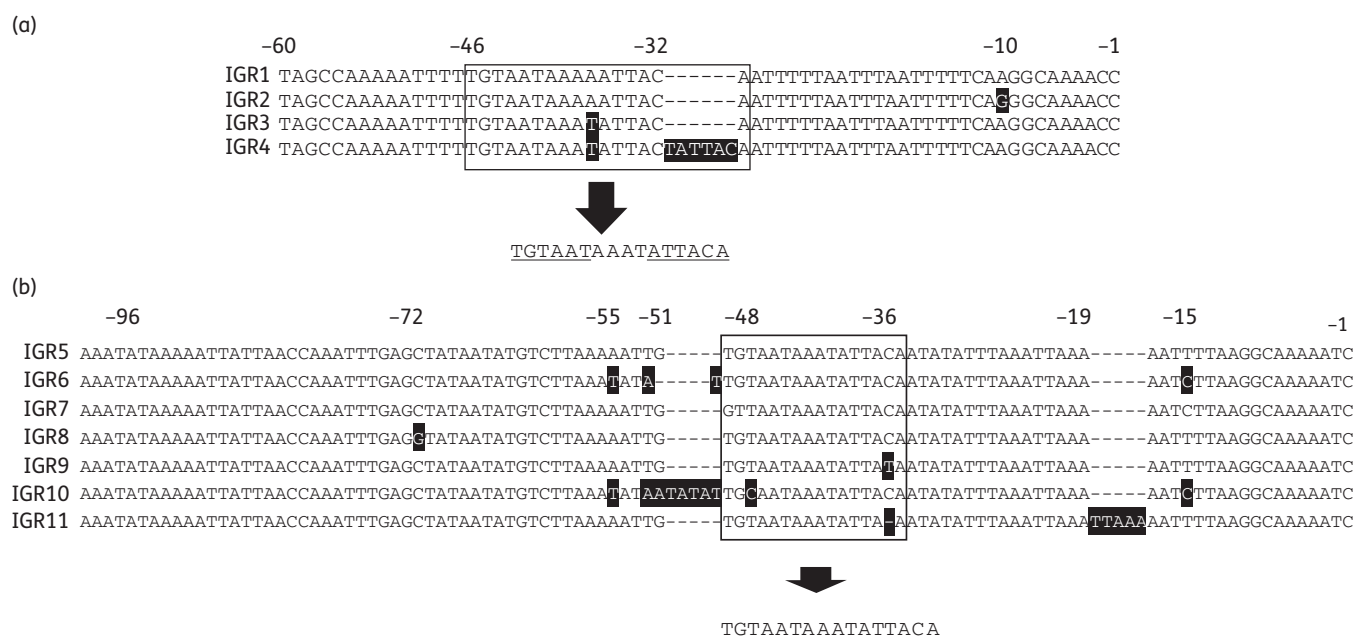


Figure 1. Partial multiple alignment of the two different intergenic regions between *cmeR* and *cmeA* identified in high-level erythromycin-resistant *C. jejuni* and *C. coli* strains. Polymorphisms are shown in black squares. The IR regions are shown inside the open squares and under the arrows the consensus sequence is shown. Repeated sequences are underlined. Positions are indicated on the top of the alignment. Partial sequences are shown. (a) Alignment of the 94 nucleotide intergenic region. Four different sequences are presented: IGR1, includes GenBank accession numbers GQ867899 and GQ867937; IGR2, GQ867936; IGR3, GQ867961–3; and IGR4, GQ867966. (b) Alignment of the 107 nucleotide intergenic region. Seven different sequences are presented: IGR5, GQ868050–1, GQ868053–4, GU384955–6, GU384960, GU384965 and GU384967; IGR6, GU384959, GU384961–4, GU384966, GU384968–9 and GU384971; IGR7, GU384970; IGR8, GU384957 and GU384958; IGR9, GU384972; IGR10, GU384966; and IGR11, GQ868057.

The real contribution of the rest of the mutations surrounding the IR region is still unknown. More studies are necessary to ascertain the real contribution to the regulation of the *cmeABC* operon.

In conclusion, our survey showed that human Spanish *C. jejuni* and *C. coli* strains had low erythromycin resistance rates. The resistance could be explained through mutations in region V of the 23S rRNA gene, the main described mechanism among campylobacters. It is noteworthy that while *rplD* and *rplV* (other mechanisms of resistance) were not affected, we found several mutations in the *cmeABC* regulation zone, which may lead to an enhanced tolerance of macrolides and other antimicrobials.

Acknowledgements

We thank the different Spanish hospitals who sent the strains. The Sequencing Unit at the National Centre of Microbiology is gratefully acknowledged for their support in this study. We gratefully thank Patricia Sánchez Barreno for her technical assistance, and for her comments and suggestions.

Funding

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III, from the Spanish Ministry of Science and Innovation (PI05/00042 to D. P.-B.).

Transparency declarations

None to declare.

Supplementary data

Table S1 is available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org/>).

References

- Allos BM. *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. *Clin Infect Dis* 2001; **32**: 1201–6.
- Thakur S, Gebreyes WA. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* in antimicrobial-free and conventional pig production systems. *J Food Prot* 2005; **68**: 2402–10.
- McGill K, Cowley D, Moran L *et al*. Antibiotic resistance of retail food and human *Campylobacter* isolates on the island of Ireland from 2001–2002. *Epidemiol Infect* 2006; **134**: 1282–91.
- Sopwith W, Ashton M, Frost JA *et al*. Enhanced surveillance of *Campylobacter* infection in the North West of England 1997–1999. *J Infect* 2003; **46**: 35–45.
- Gurtler M, Alter T, Kasimir S *et al*. The importance of *Campylobacter coli* in human campylobacteriosis: prevalence and genetic characterization. *Epidemiol Infect* 2005; **133**: 1081–7.
- Mazi W, Senok A, Al-Mahmeed A *et al*. Trends in antibiotic sensitivity pattern and molecular detection of *tet(O)*-mediated tetracycline

- resistance in *Campylobacter jejuni* isolates from human and poultry sources. *Jpn J Infect Dis* 2008; **61**: 82–4.
- 7 Engberg J, Aarestrup FM, Taylor DE et al. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerg Infect Dis* 2001; **7**: 24–34.
- 8 Wilson DL, Abner SR, Newman TC et al. Identification of ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* by use of a fluorogenic PCR assay. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 3971–8.
- 9 Rao D, Rao JR, Crothers E et al. Increased erythromycin resistance in clinical *Campylobacter* in Northern Ireland—an update. *J Antimicrob Chemother* 2005; **55**: 395–6.
- 10 Gupta A, Nelson JM, Barrett TJ et al. Antimicrobial resistance among *Campylobacter* strains, United States, 1997–2001. *Emerg Infect Dis* 2004; **10**: 1102–9.
- 11 Lin J, Cagliero C, Guo B et al. Bile salts modulate expression of the CmeABC multidrug efflux pump in *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol* 2005; **187**: 7417–24.
- 12 Prats G, Mirelis B, Llovet T et al. Antibiotic resistance trends in enteropathogenic bacteria isolated in 1985–1987 and 1995–1998 in Barcelona. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 1140–5.
- 13 Belanger AE, Shryock TR. Macrolide-resistant *Campylobacter*: the meat of the matter. *J Antimicrob Chemother* 2007; **60**: 715–23.
- 14 Ladely SR, Harrison MA, Fedorka-Cray PJ et al. Development of macrolide-resistant *Campylobacter* in broilers administered subtherapeutic or therapeutic concentrations of tylosin. *J Food Prot* 2007; **70**: 1945–51.
- 15 Gibreel A, Kos VN, Keelan M et al. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: molecular mechanism and stability of the resistance phenotype. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 2753–9.
- 16 Wierzbowski AK, Nichol K, Laing N et al. Macrolide resistance mechanisms among *Streptococcus pneumoniae* isolated over 6 years of Canadian Respiratory Organism Susceptibility Study (CROSS) (1998–2004). *J Antimicrob Chemother* 2007; **60**: 733–40.
- 17 Prunier AL, Malbrun B, Tande D et al. Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* with ribosomal mutations conferring resistance to macrolides. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 3054–6.
- 18 Versalovic J, Osato MS, Spakovsky K et al. Point mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with different levels of clarithromycin resistance. *J Antimicrob Chemother* 1997; **40**: 283–6.
- 19 Zengel JM, Jerauld A, Walker A et al. The extended loops of ribosomal proteins L4 and L22 are not required for ribosome assembly or L4-mediated autogenous control. *RNA* 2003; **9**: 1188–97.
- 20 Nakatogawa H, Ito K. The ribosomal exit tunnel functions as a discriminating gate. *Cell* 2002; **108**: 629–36.
- 21 Cagliero C, Mouline C, Cloeckaert A et al. Synergy between efflux pump CmeABC and modifications in ribosomal proteins L4 and L22 in conferring macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 3893–6.
- 22 Caldwell DB, Wang Y, Lin J. Development, stability, and molecular mechanisms of macrolide resistance in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 3947–54.
- 23 Lin J, Michel LO, Zhang Q. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 2124–31.
- 24 Pumbwe L, Piddock LJ. Identification and molecular characterisation of CmeB, a *Campylobacter jejuni* multidrug efflux pump. *FEMS Microbiol Lett* 2002; **206**: 185–9.
- 25 Cagliero C, Maurel MC, Cloeckaert A et al. Regulation of the expression of the CmeABC efflux pump in *Campylobacter jejuni*: identification of a point mutation abolishing the binding of the CmeR repressor in an *in vitro*-selected multidrug-resistant mutant. *FEMS Microbiol Lett* 2007; **267**: 89–94.
- 26 Hanninen ML, Hannula M. Spontaneous mutation frequency and emergence of ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Antimicrob Chemother* 2007; **60**: 1251–7.
- 27 Yates MD, Drobniwski FA, Wilson SM. Evaluation of a rapid PCR-based epidemiological typing method for routine studies of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 712–4.
- 28 Persson S, Olsen KE. Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. *J Med Microbiol* 2005; **54**: 1043–7.
- 29 Wang G, Clark CG, Taylor TM et al. Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 4744–7.
- 30 Mateo E, Carcamo J, Urquijo M et al. Evaluation of a PCR assay for the detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in retail poultry products. *Res Microbiol* 2005; **156**: 568–74.
- 31 Gaudreau C, Gilbert H. Comparison of disc diffusion and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Antimicrob Chemother* 1997; **39**: 707–12.
- 32 Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Sixteenth Informational Supplement M100-S16*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2007.
- 33 Guo B, Lin J, Reynolds DL et al. Contribution of the multidrug efflux transporter CmeABC to antibiotic resistance in different *Campylobacter* species. *Foodborne Pathog Dis* 2010; **7**: 77–83.
- 34 Reina J, Ros MJ, Serra A. Susceptibilities to 10 antimicrobial agents of 1,220 *Campylobacter* strains isolated from 1987 to 1993 from feces of pediatric patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; **38**: 2917–20.
- 35 Sanchez R, Fernandez-Baca V, Diaz MD et al. Evolution of susceptibilities of *Campylobacter* spp. to quinolones and macrolides. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; **38**: 1879–82.
- 36 Corcoran D, Quinn T, Cotter L et al. An investigation of the molecular mechanisms contributing to high-level erythromycin resistance in *Campylobacter*. *Int J Antimicrob Agents* 2006; **27**: 40–5.
- 37 Vester B, Douthwaite S. Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 1–12.
- 38 Miller WG, Englen MD, Kathariou S et al. Identification of host-associated alleles by multilocus sequence typing of *Campylobacter coli* strains from food animals. *Microbiology* 2006; **152**: 245–55.
- 39 D'Lima CB, Miller WG, Mandrell RE et al. Clonal population structure and specific genotypes of multidrug-resistant *Campylobacter coli* from Turkey. *Appl Environ Microbiol* 2007; **73**: 2156–64.
- 40 Moore SD, Sauer RT. Revisiting the mechanism of macrolide-antibiotic resistance mediated by ribosomal protein L22. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 18261–6.
- 41 Grkovic S, Brown MH, Schumacher MA et al. The staphylococcal QacR multidrug regulator binds a correctly spaced operator as a pair of dimers. *J Bacteriol* 2001; **183**: 7102–9.

ARTÍCULOS ADICIONALES

Artículo Adicional 1.

“Isolation and Characterization of *Campylobacter* spp. from Antarctic Fur Seals (*Arctocephalus gazella*) at Deception Island, Antarctica”

“Aislamiento y caracterización de *Campylobacter* spp. a partir de lobos marinos antárticos (*Arctocephalus gazella*) en la Isla Decepción, Antártida”

Resumen del artículo:

La presencia de *Campylobacter* spp. fue investigada en 41 lobos marinos antárticos (*Arctocephalus gazella*) y en 9 focas de Weddell (*Leptonychotes weddellii*) en la Isla Decepción, Antártida. Se encontró infecciones en seis lobos marinos antárticos. Los aislados, por primera vez comunicados de mamíferos marinos en la región antártica, fueron identificados como *Campylobacter insulaenigrae* y *Campylobacter lari*.

Isolation and Characterization of *Campylobacter* spp. from Antarctic Fur Seals (*Arctocephalus gazella*) at Deception Island, Antarctica[▽]

F. J. García-Peña,^{1*} D. Pérez-Boto,² C. Jiménez,¹ E. San Miguel,¹ A. Echeita,² C. Rengifo-Herrera,³
D. García-Párraga,⁴ L. M. Ortega-Mora,³ and S. Pedraza-Díaz³

LCV de Algete, Madrid, Spain¹; Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain²;
SALUVET, Animal Health Department, Faculty of Veterinary Sciences, Complutense University of Madrid, Ciudad Universitaria s/n,
28040 Madrid, Spain³; and L'Oceanogràfic, Ciudad de las Artes y de las Ciencias, Junta de Murs i Valls s/n, 46013 Valencia, Spain⁴

Received 5 February 2010/Accepted 7 July 2010

The presence of *Campylobacter* spp. was investigated in 41 Antarctic fur seals (*Arctocephalus gazella*) and 9 Weddell seals (*Leptonychotes weddellii*) at Deception Island, Antarctica. Infections were encountered in six Antarctic fur seals. The isolates, the first reported from marine mammals in the Antarctic region, were identified as *Campylobacter insulaenigrae* and *Campylobacter lari*.

The Antarctic and sub-Antarctic regions are often regarded as pristine landscapes, unaffected by human activity. A limited number of surveys have been carried out to investigate the possible occurrence of zoonotic enteropathogens and if certain bacteria could be used as tools for evaluating biological pollution in this area (4, 11). In the case of *Campylobacter* species, there have been only three reports in the literature, but in all of them *Campylobacter* was isolated from marine seabirds but not from marine mammals. *Campylobacter jejuni* was isolated in Antarctic and sub-Antarctic areas from Macaroni penguins (*Eudyptes chrysolophus*) (4), and *Campylobacter lari* was isolated from Brown skuas, South Polar skuas, and Adelie penguins (2, 11).

Reports of *Campylobacter* species isolated from marine mammals are rare. *Campylobacter insulaenigrae* was isolated from three harbor seals (*Phoca vitulina*) and a harbor porpoise (*Phocoena phocoena*) in Scotland (7). The isolation of *C. jejuni*, *C. lari*, and an unknown *Campylobacter* species from juvenile northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*) in California was also reported (22). Finally, 71 isolates of *C. insulaenigrae* and 1 isolate similar to but distinct from both *Campylobacter upsaliensis* and *Campylobacter helveticus* were isolated from northern elephant seals in California (23). In the South Georgia Archipelago, fecal swabs were taken from 206 Antarctic fur seal pups, but no isolates could be obtained (4). In this study, we successfully isolated *C. lari* from 7.3% of Antarctic fur seals (*Arctocephalus gazella*) sampled and *C. insulaenigrae* from a further 7.3%. On the other hand, *Campylobacter* was not detected in the nine Weddell seals (*Leptonychotes weddellii*) sampled. To our knowledge, this is the first report on the isolation of *C. lari* and *C. insulaenigrae* from marine mammals in the Antarctic region.

Fieldwork was conducted at Deception Island (latitude of 62°58'S and longitude of 60°40'W), in the South Shetland Islands. During January to February 2007, Antarctic fur seals

(*Arctocephalus gazella*) and Weddell seals (*Leptonychotes weddellii*) were captured and fecal samples were collected by insertion of sterile cotton wool swabs into the rectum of the marine mammals. A total of 41 Antarctic fur seals and 9 Weddell seals were sampled. The distribution by ages was of 7 adults (over 4 years of age with breeding activity), 19 subadults (2 to 4 years of age), and 15 juvenile Antarctic fur seals (less than 2 years of age), and 8 adult Weddell seals and 1 juvenile. All animals presented a good body condition and showed no symptoms at the time of sampling.

Three swabs were taken from each animal and were placed in FBP medium (8) with 0.5% active charcoal (Sigma Ltd.), Amies transport medium with charcoal, and Cary Blair transport medium, respectively. All samples were kept at +4 to 8°C until culture in the lab. The number of days between sampling and cultivation varied from 96 to 124 days, with a median value of 105 days.

Each swab was placed in 10 ml of *Campylobacter* enrichment broth (Lab M) with 5% laked horse blood and CAT supplement (cefoperazone [8 µg/ml], teicoplanin [4 µg/ml], and amphotericin B [10 µg/ml]) at 37°C. The broth was incubated at 37°C for 48 h and 5 days in 3.5-liter anaerobic containers using CampyGen sachets (Oxoid), before an aliquot of 100 µl was plated onto CAT agar and the plates were incubated at 37°C for 72 h in a microaerobic atmosphere. In addition, a 47-mm-diameter cellulose membrane with 0.60-µm pores was placed on the surface of an anaerobe agar base (Oxoid) with 5% laked horse blood. Eight to 10 drops of enrichment broth (200 µl) were placed onto the surface of the membrane. The membrane was left for 20 to 30 min on the agar surface at room temperature until all of the fluid had passed through (20). The plates were incubated as described above, but for 5 days to isolate the less common, slower growing species.

Isolates were examined by dark-field microscopy to determine morphology and motility and tested to determine whether oxidase was produced. For each sample, five isolates from each of the solid media that had typical morphology and motility and for which the oxidase test was positive were frozen at –80°C in FBP medium (8) until they were tested by phenotypic and genotypic methods.

* Corresponding author. Mailing address: LCV de Algete, Bacteriology Department, Madrid-Algete Road, km 8.00, 28110 Algete, Madrid, Spain. Phone: 34 913479268. Fax: 34 916290598. E-mail: fgarcia@mapya.es.

[▽] Published ahead of print on 16 July 2010.

Original *Campylobacter* identification was done by Gram staining, catalase activity, hippurate hydrolysis, ability to hydrolyze indoxyl acetate, urease activity, H₂S production on triple-sugar iron slants, growth at 25°C and 42°C in a microaerophilic environment, growth at 37°C in an aerobic atmosphere, and agglutination with Microscreen latex (Microgen, Camberley, United Kingdom).

No differences between the strains were observed in any of the phenotypic tests used. All isolates showed a Gram-negative, slender, curved, seagull wing-like morphology under light microscopy and positive reactions in the catalase test. They were negative for hippurate and indoxyl acetate hydrolysis and urease and did not show H₂S production. In addition, they grew at 42°C but did not grow at 25°C or 37°C in an aerobic atmosphere. Finally, all of them were positive in the agglutination test.

Because phenotypic results commonly lead to misidentification of *Campylobacter* species, it is recommended that a molecular method be included in the identification scheme for *Campylobacter* (5, 15). Identification of the isolates was performed using 16S rRNA gene PCR and sequence analysis (15, 21). Forward and reverse conserved 16S rRNA eubacterial primers 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA G-3') and 1492R (5'-GGTACCTTGTACGACTT-3') were used to amplify the 16S rRNA according to the protocol described by Jang et al. (9). Forward and reverse sequencing reactions were performed by the Laboratorio Central de Veterinaria's DNA sequencing facility (LCV Algete, Madrid, Spain). Three strains were identified as *C. lari* and the other three as *C. insulaenigrae* based on both forward and reverse sequence analysis.

Molecular characterization of strains was carried out using a combination of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) using KpnI enzyme and multilocus sequence typing (MLST). Preparation of intact *Campylobacter* DNA for PFGE was performed following the Pulsenet protocol (17, 24). PFGE for the restriction enzyme KpnI (Takara, Conda, Spain) was performed following the protocol described by Ribot et al. (17). DNA fragments were resolved on 0.9% Seakem Gold agarose gels (Iberlabo, Spain) with a Bio-Rad CHEF DRII system (Bio-Rad, Spain) at 14°C and 6 V/cm. Electrophoresis was carried out for 22 h with pulse times ramping from 4 s to 20 s. The fingerprinting experiments were analyzed using the InfoQuest FP software (Bio-Rad, Spain), and the dendrogram was constructed using the unweighted-pair group method using average linkages (UPGMA).

MLST of *C. lari* strains was performed as described by Miller et al. (13). In the case of *C. insulaenigrae* strains, MLST was performed following the protocol described by Stoddard et al. (23). All amplicons were sequenced by the Sequencing Service of the Instituto de Salud Carlos III (Madrid, Spain). Sequence data were collated, and alleles were assigned using the *Campylobacter* PubMLST database (<http://pubmlst.org/campylobacter/>). Novel alleles and sequence types were submitted for allele and sequence type (ST) designations when appropriate.

Regarding the age distribution of animals, *C. lari* was isolated from 1 of 7 adult (14.3%), 1 of 19 subadult (5.3%), and 1 of 15 juvenile (6.6%) Antarctic fur seals. *C. insulaenigrae* was isolated from 1 of 7 adults (14.3%) and 2 of 19 of subadults (10.5%) but not from juvenile animals (Table 1). All strains

TABLE 1. Source of *Campylobacter* isolates

Animal	Age category and sex	Date (mo/day/yr) of:		<i>Campylobacter</i> sp. and isolate no.
		Sampling	Culture	
L 06/56	Adult male	2/15/07	5/30/07	<i>C. insulaenigrae</i> FR-07
L 06/78	Subadult male	2/15/07	5/30/07	<i>C. insulaenigrae</i> FR-15
L 06/102	Subadult male	2/22/07	5/30/07	<i>C. lari</i> FR-28
L 06/134	Juvenile male	2/21/07	5/30/07	<i>C. lari</i> FR-36
L 06/146	Subadult male	2/22/07	5/30/07	<i>C. insulaenigrae</i> FR-38
L 06/48	Adult male	2/22/07	5/30/07	<i>C. lari</i> FR-48

were obtained from the swabs kept in FBP transport medium.

Campylobacter is very sensitive to excessive amounts of oxygen and has little capacity to survive in the environment. It is therefore possible that the prevalence of *Campylobacter* species in Antarctic fur seals is greater than that obtained in our survey and that we have isolated more-resistant strains with a larger ability to survive a prolonged transport. Nevertheless, we think that the freezing medium described by Gorman and Adley (8) modified by the addition of 0.5% of activated charcoal is a very good transport medium since the bacteria remained viable for 3 months at refrigeration temperature, whereas they did not survive in the transport media routinely used for the preservation of fecal samples such as Amies and Cary Blair media.

PFGE is a useful tool for conducting epidemiological studies of *Campylobacter* species. We used digestion with KpnI because it has been reported to have greater power of discrimination than digestion with SmaI (16). All isolates showed very different patterns (Fig. 1), indicating different sources of infection and circulation of different clones on Deception Island. These data were confirmed by the results of MLST, in which each strain belonged to a different ST, none of which had been previously reported. We submitted to the MLST database 12 new sequences of alleles tested for *C. insulaenigrae* and 10 new sequences of *C. lari* obtained (Table 2).

The introduction of *C. lari* in the Antarctic fur seal colonies may have occurred through seabirds. *C. lari* has been isolated from Adelie penguins (*Pygoscelis adeliae*), kelp gull (*Larus dominicanus*), Brown skuas (*Stercorarius antarctica lonnbergi*), and South Polar skuas (*Stercorarius maccormicki*) in Hope Bay (11) and in the Antarctic Peninsula (2). Gulls can travel between South America and Antarctica and are potential carriers of enteric pathogens (1). Thus, *C. lari* has been isolated from kelp gulls in southern Chile (6). Also, South Polar skuas have been reported in Greenland and the Aleutian Islands and Brown skuas move around the Antarctic coast. Therefore, it is possible that these birds acquire infectious organisms when they move to areas with high levels of human activity. These birds have been reported on Deception Island (10), and it is common to find skuas and giant petrels on beaches where Antarctic fur seal colonies rest. The carrier birds could eliminate *Campylobacter* and pollute these areas. Alternatively, these birds could be occasional prey for Antarctic fur seals.

C. insulaenigrae is a new *Campylobacter* species whose host range might be restricted to marine mammals (23). It could be hypothesized that *C. insulaenigrae* evolved from *C. lari* based on the presence of both species in sea lions and their sharing

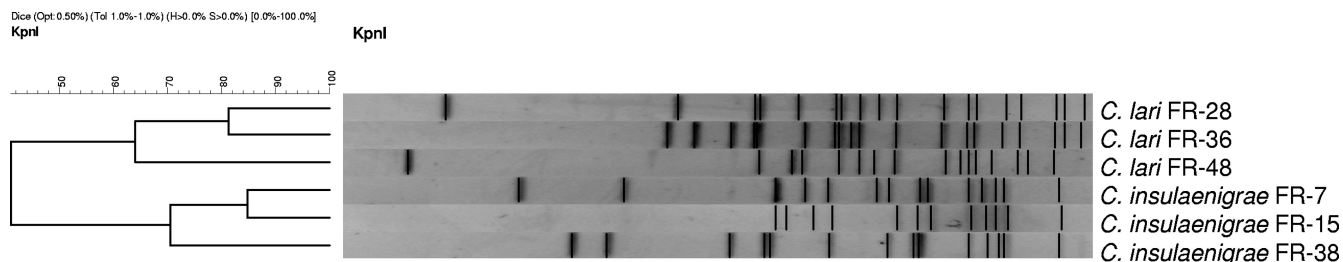


FIG. 1. UPGMA dendrogram of PFGE profiles.

other characteristics such as the absence of the citrate synthase gene (23). In addition, considering that *C. insulaenigrae* has not been isolated from seabirds or shellfish and the migration ranges of sea lions are generally not very large, Antarctic fur seals could have been initially infected with *C. lari*, and subsequently this species has evolved, adapting to mammals. Alternatively both species could share an ancestor and have adapted to different hosts.

The Antarctic fur seals captured showed no weight loss, diarrhea, or other symptoms at the time of sampling. However, due to the nature of our study, it is not possible to know whether the animal had been ill before the time of collection and was subsequently a carrier. Taking into account previous reports (7, 23) and our results, pinnipeds could possibly act as reservoir of *C. insulaenigrae*.

The presence of *Campylobacter* in Antarctic fur seals could also be important due to the zoonotic potential of both species (5, 12, 18, 19). Therefore, researchers should continue to exercise caution when working with these animals. In addition, *C. lari* has been involved in waterborne outbreaks (3) and some reports have identified this species as the most frequently isolated from surface water (25). Most of the Antarctic stations' catchwater from lakes generated by meltwater and the water treatment cannot be accomplished by chemical products to prevent marine pollution. In general, water is not treated or is treated only by filtration and UV light. Antarctic fur seals can nevertheless pollute the water of these lakes and/or infect other species such as penguins and other birds, which in turn could also act as a source of infection for humans. Furthermore, Obiri-Danso et al. (14) have reported that *C. lari* survives for longer in surface waters than *C. jejuni* and *Campy-*

lobacter coli, so it would have a greater chance of surviving the water treatment. Finally, in case of infection, the therapy may be complicated because in many of the stations there are only basic medical services.

In summary, we describe here the first isolation and characterization of two species of *Campylobacter*, *C. lari* and *C. insulaenigrae*, from Antarctic fur seals. Further studies are needed to determine the prevalence of *Campylobacter* spp. in Antarctic pinnipeds, the possible sources of infection and if the presence of *Campylobacter* in marine mammals could be a risk for human illness or could be a result of microbial pollution associated with human activity.

This work was funded by the Spanish Ministry of Education and Science (CGL-2004-22025-E/ANT and CGL-2005-25073-E/ANT).

We thank the military personnel at the Spanish Antarctic Base "Gabriel de Castilla" for their help and assistance and the Marine Technology Unit (CSIC) and the Spanish Navy's Oceanographic Research Ship "Las Palmas" for their help, logistics, and transport.

REFERENCES

1. Abulreesh, H. H., R. Goulder, and G. W. Scott. 2007. Wild birds and human pathogens in the context of ringing and migration. *Ring Migration* **23**: 193–200.
2. Bonnedahl, J., T. Broman, S. Waldenström, H. Palmgren, T. Niskanen, and B. Olsen. 2005. In search of human-associated bacterial pathogens in Antarctic wildlife: report from six penguin colonies visited by tourists. *Ambio* **34**:430–432.
3. Broczyk, A., S. Thompson, D. Smith, and H. Lior. 1987. Water-borne outbreak of *Campylobacter laridis*-associated gastroenteritis. *Lancet* **i**:164–165.
4. Broman, T., S. Bergström, S. L. W. On, H. Palmgren, D. J. McCafferty, M. Sellin, and B. Olsen. 2000. Isolation and characterization of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* from Macaroni penguins (*Eudyptes chrysoslophus*) in the subantarctic region. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:449–452.
5. Chua, K., V. Gürtler, J. Montgomery, M. Fraenkel, B. C. Mayall, and M. L. Grayson. 2007. *Campylobacter insulaenigrae* causing septicaemia and enteritis. *J. Med. Microbiol.* **56**:1565–1567.
6. Fernández, H., W. Gesche, A. Montefusco, and R. Schlatter. 1996. Wild birds as reservoir of thermophilic *Campylobacter* species in southern Chile. 1996. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **9**:699–700.
7. Foster, G., B. Holmes, A. G. Steigerwalt, P. A. Lawson, P. Thorne, D. E. Byrre, H. M. Ross, J. Kerry, P. M. Thompson, and M. D. Collins. 2004. *Campylobacter insulaenigrae* sp. nov., isolated from marine mammals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**:2369–2373.
8. Gorman, R., and C. C. Adley. 2004. An evaluation of five preservation techniques and conventional freezing temperatures of -20°C and -85°C for long-term preservation of *Campylobacter jejuni*. *Lett. Appl. Microbiol.* **38**: 306–310.
9. Jang, S. S., J. M. Donahue, A. B. Arata, J. Goris, L. M. Hansen, D. L. Earley, P. A. Vandamme, P. J. Timoney, and D. C. Hirsh. 2001. *Taylorella asinigenitalis* sp. nov., a bacterium isolated from the genital tract of male donkeys (*Equus asinus*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:971–976.
10. Kendall, K. A., H. A. Ruhl, and R. C. Wilson. 2003. Distribution and abundance of marine birds and pinniped populations within Port Foster, Deception Island, Antarctica. *Deep Sea Res. II* **50**:1883–1888.
11. Leotta, G., G. Vigo, and G. Giacoboni. 2006. Isolation of *Campylobacter lari* from seabirds in Hope Bay, Antarctica. *Pol. Polar Res.* **27**:303–308.
12. Martinot, M., B. Jaulhac, R. Moog, S. De Martino, P. Kehrl, H. Monteil,

TABLE 2. Allele numbers and sequence types of *Campylobacter* isolates

Species and isolate no.	ST	Allele no. ^a						
		<i>aspA</i> or <i>adk</i>	<i>atpA</i>	<i>glnA</i>	<i>glyA</i>	<i>pgi</i>	<i>pgm</i>	<i>tki</i>
<i>C. insulaenigrae</i>								
FR-7	41	2 (<i>aspA</i>)	16*	12*	2	15*	15*	11*
FR-15	42	4 (<i>aspA</i>)	10	11*	12*	14*	15*	12*
FR-38	43	7 (<i>aspA</i>)	17*	11*	13*	14*	3	13*
<i>C. lari</i>								
FR-28	17	52* (<i>adk</i>)	57*	2	50*	56*	51*	31*
FR-36	16	52* (<i>adk</i>)	57*	2	2	56*	52*	31*
FR-48	18	53* (<i>adk</i>)	58*	1	2	57*	52*	32*

^a Asterisks indicate new alleles.

- and Y. Piemont. 2001. *Campylobacter lari* bacteremia. Clin. Microbiol. Infect. 7:96–97.
13. Miller, W. G., S. L. W. On, G. Wang, S. Fontanoz, A. J. Lastovica, and R. E. Mandrell. 2005. Extended multilocus sequence typing system for *Campylobacter coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. helveticus*. J. Clin. Microbiol. 43:2315–2329.
 14. Obiri-Danso, K., N. Paul, and K. Jones. 2001. The effects of UVB and temperature on the survival of natural populations and pure cultures of *Campylobacter jejuni*, *Camp. coli*, *Camp. lari* and urease-positive thermophilic campylobacters (UPTC) in surface waters. J. Appl. Microbiol. 90:256–267.
 15. On, S. L. 1996. Identification methods for campylobacters, helicobacters, and related organisms. Clin. Microbiol. Rev. 9:405–422.
 16. On, S. L. W., E. M. Nielsen, J. Engberg, and M. Madsen. 1998. Validity of *Sma*-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by *SalI*, *KpnI* and *BamHI* polymorphisms: evidence of identical clones infecting humans, poultry and cattle. Epidemiol. Infect. 120:231–237.
 17. Ribot, E. M., C. Fitzgerald, K. Kubota, B. Swaminathan, and T. J. Barrett. 2001. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. J. Clin. Microbiol. 39:1889–1894.
 18. Rosef, O., G. Johnsen, A. Stølan, and H. Klæboe. 2008. Similarity of *Campylobacter lari* among human, animal, and water isolates in Norway. Foodborne Pathog. Dis. 5:33–39.
 19. Soderstrom, C., C. Schalen, and M. Walder. 1991. Septicemia caused by an unusual *Campylobacter* species (*C. lariidis* and *C. mucosalis*). Scand. J. Infect. Dis. 23:369–371.
 20. Steele, T. W., and S. N. McDermott. 1984. The use of membrane filters applied directly to the surface of agar plates for the isolation of *C. jejuni* from faeces. Pathology 16:263–265.
 21. Steinhäuserová, I., J. Cesková, K. Fojtiková, and I. Obrovská. 2001. Identification of thermophilic *Campylobacter* spp by phenotypic and molecular methods. J. Appl. Microbiol. 90:470–475.
 22. Stoddard, R. A., F. M. D. Gulland, E. R. Atwill, J. Lawrence, S. Jang, and P. A. Conrad. 2005. *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in northern elephant seals, California. Emerg. Infect. Dis. 11:1967–1969.
 23. Stoddard, R. A., W. G. Miller, J. E. Foley, J. Lawrence, F. M. Gulland, P. A. Conrad, and B. A. Byrne. 2007. *Campylobacter insulaenigrae* isolates from northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*) in California. Appl. Environ. Microbiol. 73:1729–1735.
 24. Swaminathan, B., T. J. Barrett, S. B. Hunter, and R. V. Tauxe. 2001. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. Emerg. Infect. Dis. 7:382–389.
 25. Van Dyke, M. I., V. K. Morton, N. L. McLellan, and P. M. Huck. 29 March 2010, posting date. The occurrence of *Campylobacter* in river water and waterfowl within a watershed in Southern Ontario, Canada. J. Appl. Microbiol. [Epub ahead of print.] doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04730.x.

Artículo Adicional 2.

“Application of RFLP-PCR-*flaA* and resistotype to identify potential undiagnosed outbreaks of campylobacteriosis in Spain.”

“Aplicación de RFLP-PCR-*flaA* y resistotipo para identificar potenciales brotes de Campilobacteriosis sin diagnosticar en España.”

Resumen del artículo:

Introducción: Los brotes de campilobacteriosis son poco frecuentes y por lo general cursan con un bajo número de pacientes, sin embargo se estima que muchos más permanecerían sin diagnosticar. Las técnicas de investigación de brotes más exitosas en *Campylobacter* spp. (PFGE, MLST) tienen el inconveniente de ser laboriosas y no disponibles en la mayoría de laboratorios.

Métodos: Durante el año 2008 se recibieron 334 aislados de *C. jejuni* y *C. coli* procedentes de 16 hospitales. Todas las cepas fueron tipificadas molecularmente mediante RFLP-PCR-*flaA* (Tipo *flaA*) y fenotípicamente con su resistotipo. Se consideró que aquellas cepas de la misma especie que procedieran del mismo hospital, aisladas en un periodo de hasta 11 días, con valores de CMI de más/menos una dilución y con el mismo tipo *flaA* podrían pertenecer a un brote. Todas las cepas que cumplían con estos criterios fueron tipificadas mediante *KpnI*-PFGE y MLST

Resultados: Pese a la variabilidad del marcador RFLP-PCR-*flaA* (51 tipos diferentes durante el año 2008), se encontraron 10 grupos (23 cepas) que cumplían con los criterios de un posible brote no diagnosticado. En todos los casos la semejanza entre los pulsotipos (PFGE) fue superior al 99% y los secuenciotipos (MLST) fueron coincidentes en todos los casos.

Conclusiones: Hemos demostrado cómo usando dos marcadores feno y genotípicos sencillos (resistotipo y tipo *flaA*) se pueden investigar posibles brotes de campilobacteriosis no diagnosticados. La necesidad de disponer de datos epidemiológicos hace que no se puedan confirmar los brotes totalmente. El estudio confirma que como en otros países, el número de brotes de campilobacteriosis en España está probablemente infraestimado.



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

Aplicación del análisis de los polimorfismos de los tamaños de los fragmentos de restricción del gen *flaA* amplificado por reacción en cadena de la polimerasa y resistotipo para identificar potenciales brotes de campilobacteriosis no diagnosticados en España[☆]

David Pérez-Boto*, José Antonio López-Portolés, Cristina Simón y María Aurora Echeita

Unidad de Enterobacterias, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 15 de abril de 2013

Aceptado el 16 de julio de 2013

On-line el xxx

Palabras clave:

Campylobacter

Brotes no diagnosticados

flaA

Electroforesis en campo pulsante

Secuenciación de múltiples *locus* de genes constitutivos

R E S U M E N

Introducción: Los brotes detectados de campilobacteriosis son poco frecuentes y, por lo general, cursan con un bajo número de pacientes, aunque se estima que muchos más permanecerían sin diagnosticar. Las técnicas de investigación de brotes más exitosas en *Campylobacter* spp. (PFGE, MLST) tienen el inconveniente de ser laboriosas y no estar disponibles en muchos laboratorios.

Métodos: Durante el año 2008 se recibieron 352 aislados de *C. jejuni* y *C. coli* procedentes de 16 hospitales. Todas las cepas fueron tipificadas genotípicamente mediante RFLP-PCR-*flaA* (tipo *flaA*) y fenotípicamente con su resistotipo. Se estableció que aquellas cepas de la misma especie procedentes del mismo hospital, aisladas en un periodo de hasta 11 días, con valores de CMI de ± 1 dilución y con el mismo tipo *flaA*, podrían pertenecer a un brote. Las cepas que cumplieren con estos criterios serían posteriormente tipificadas mediante *KpnI*-PFGE y MLST.

Resultados: Veintitrés de los 352 aislados, en 10 grupos, cumplían con los criterios de pertenencia a posibles brotes no diagnosticados. En 8 grupos los pulsotipos (PFGE) de los aislados de cada grupo tenían una semejanza entre ellos mayor del 95%. En 7 de ellos los secuenciotipos (MLST) eran coincidentes.

Conclusiones: El uso de 2 marcadores sencillos (resistotipo y RFLP-PCR-*flaA*) puede detectar aislados que probablemente formen parte de un brote de campilobacteriosis no diagnosticado. Para su confirmación se requieren otros marcadores moleculares y los datos epidemiológicos de cada aislado. El estudio apunta a que, como en otros países, el número de brotes de campilobacteriosis en España está probablemente infraestimado.

© 2013 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Application of restriction fragment length polymorphism-polymerase chain reaction-*flaA* and resistotype to identify potential undiagnosed outbreaks of campylobacteriosis in Spain

A B S T R A C T

Keywords:

Campylobacter

Undiagnosed outbreaks

flaA

Pulse field gel electrophoresis

Multi-locus sequence typing

Introduction: Outbreaks of campylobacteriosis are infrequent and usually involve a low number of patients, although it is estimated that many more remain undiagnosed. The most successful techniques for outbreak investigation in *Campylobacter* spp. (PFGE, MLST) have the drawback of being laborious and not available in many laboratories.

Methods: During the year 2008, 352 isolates of *C. jejuni* and *C. coli* from 16 hospitals were received in our laboratory. All strains were genotyped by RFLP-PCR-*flaA* (*flaA* type) and phenotyped with their resistotype. It was established that the strains of the same species from the same hospital, isolated over a period of up to 11 days, with MIC values of ± 1 dilution with the same *flaA* type could belong to an outbreak. Strains that met these criteria would be later subtyped by *KpnI*-PFGE and MLST.

[☆] Actualmente, el primer autor posee una beca en la "Sección de Microbiología Alimentaria". Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). Madrid, España.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: dperez@externos.msssi.es (D. Pérez-Boto).

Results: A total of 23 out of 352 isolates, distributed in 10 groups, met the criteria for being associated with putative undiagnosed outbreaks. The similarity of the PFGE-profiles in 8 groups was greater than 95% among the isolates from each group. In 7 of the groups, the sequence types (MLST) were coincident. **Conclusions:** The use of 2 easy markers (resistotype and RFLP-PCR-*flaA*) may detect isolates probably belonging to an undiagnosed outbreak of campylobacteriosis. Accurate diagnosis requires other molecular markers and epidemiological data of each isolate. The study suggests that, as in other countries, the number of outbreaks of campylobacteriosis in Spain is probably underestimated.

© 2013 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Las especies termofílicas del género *Campylobacter* (principalmente *C. jejuni* junto con *C. coli*) son la principal causa de gastroenteritis bacteriana a nivel mundial¹. Se estima que debido a las características de la infección, con una sintomatología en ocasiones leve, la mayoría de los datos de campilobacteriosis están infraestimados². El consumo o manipulación de la carne de pollo es contemplado como el principal factor de riesgo en la adquisición de la infección, aunque la mayoría de los casos son esporádicos³. A diferencia de otros patógenos alimentarios, como *Salmonella enterica* o *Staphylococcus aureus*, los brotes de campilobacteriosis se notifican de forma infrecuente y, por lo general, implicando un número reducido de casos⁴. Salvo algunos incidentes documentados en la literatura científica, los brotes con mayor número de casos se asocian principalmente al consumo de agua⁵, como por ejemplo 442 casos en Finlandia durante el verano del año 1998⁶, 105 en Noruega⁷ o 71 en Japón⁸.

La investigación de brotes en patógenos alimentarios se basa en la comparación de diferentes marcadores fenotípicos y genotípicos, junto con los datos epidemiológicos preexistentes, para establecer si las cepas investigadas tienen un origen común. Generalmente se considera que la técnica de tipificación molecular de elección en investigación de brotes es la *pulse field gel electrophoresis* (PFGE, «electroforesis en gel de campo pulsante») ^{9,10}, aunque en los últimos años se empiezan a utilizar otras como la tipificación por *multi-locus sequence typing* (MLST, «secuenciación de múltiples locus de genes constitutivos») ¹¹. En *Campylobacter* la investigación de brotes puede ser complicada por la posible coexistencia de más de una cepa dentro de un brote individual¹², esto es más evidente en los brotes originados por consumo de carne de pollo, frecuentemente colonizada por más de una cepa diferente¹³. Otra característica que dificulta el estudio de dichos brotes es la inestabilidad genética que se le atribuye a *Campylobacter*¹⁴, que hace que los perfiles moleculares puedan variar entre los aislados de un mismo brote.

Se estima que los brotes de campilobacteriosis deben ser en realidad mucho más frecuentes de lo informado, debido al bajo número de casos implicado³ y al diferente periodo de incubación que pueden tener los pacientes comprendidos en el brote, de hasta 11 días¹⁵.

El objetivo de nuestro trabajo fue investigar posibles brotes de campilobacteriosis no diagnosticados, basándonos en 2 métodos de tipificación sencillos como son el perfil de resistencia de las cepas frente a antimicrobianos (valores de las concentraciones mínimas inhibitorias [CMI]) y la determinación del tipo *flaA* mediante polimorfismos de los tamaños de los fragmentos de restricción del gen *flaA* amplificado por reacción en cadena de la polimerasa (RFLP-PCR-*flaA*). Los datos que proporcionan ambos marcadores permiten preseleccionar grupos de aislados que deben ser confirmados como parte de un mismo brote mediante la aplicación de otros marcadores complementarios, junto con los datos epidemiológicos existentes.

Métodos

Origen e identificación de los aislados

Durante el año 2008 se recibieron en el Laboratorio de *Campylobacter*, perteneciente al Centro Nacional de Microbiología, 352 aislados de *Campylobacter* spp. procedentes de 16 hospitales españoles. En este periodo solo se remitió de forma específica un brote que implicaba 8 aislados de *C. jejuni*, siendo la relación entre el resto de aislados desconocida, aunque teóricamente corresponderían a casos esporádicos. En todos los aislados recibidos se determinó la especie a la que pertenecían mediante técnicas de PCR¹⁶⁻¹⁸ o de secuenciación de diferentes genes diana (ADNr 16S, *cpn60*)^{19,20}.

Test de sensibilidad a antimicrobianos y resistotipo de las cepas

Para todos los aislados de *Campylobacter* recibidos en el laboratorio se realizaron tests de sensibilidad frente a los siguientes antimicrobianos: ciprofloxacino, eritromicina, gentamicina, amoxicilina, amoxicilina más ácido clavulánico, cloranfenicol y tetraciclina (codificación según WHONET)²¹ mediante tiras E-test (bioMérieux, España). Se siguieron las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute* tanto en la realización del método (turbidez del inóculo, medio de cultivo y cepa ATCC 33560 de *C. jejuni* como control de calidad), como en los puntos de corte de las CMI para diferenciar poblaciones sensibles y resistentes.

Puesto que en el *Clinical and Laboratory Standards Institute* solo están disponibles los puntos de corte para eritromicina, tetraciclina y ciprofloxacino²², para el resto de antimicrobianos los puntos de corte fueron seleccionados del *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (disponibles en http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/) (consultada 4/04/2013).

Siguiendo criterios ya publicados, consideramos a un aislado como multirresistente cuando era resistente frente a 3 o más grupos de antimicrobianos²³.

Reacción en cadena de la polimerasa. Tipificación por polimorfismos de los tamaños de los fragmentos de restricción-reacción en cadena de la polimerasa-*flaA* y secuenciación de múltiples locus de genes constitutivos. Asignación de tipos *flaA* y secuenciotipos

Para todas las PCR necesarias en el estudio se utilizó el kit de extracción de ADN genómico InstaGene Matrix (Bio-Rad, España) y el kit de amplificación de ADN Ready-To-Go System (GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido).

El análisis de RFLP-PCR-*flaA* se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Nachamkin et al.²⁴. En resumen, se digieren 5 µl del producto de amplificación obtenido mediante PCR con 6 unidades de enzima de restricción *DdeI* (FastDigest®, Fermentas GmbH, Madrid, España) a 37 °C. Los fragmentos generados en la digestión se separaron en una electroforesis en agarosa (2,5% peso/volumen) tipo MS-8 (Pronadisa, España) en buffer TAE 1X.

Tabla 1

Tabla resumen con los datos epidemiológicos más relevantes de los aislados dentro de cada supuesto brote, los porcentajes de semejanza entre los pulsotipos obtenidos con la enzima *KpnI*, así como el secuenciotipo

N.º de brote	Hospital	N.º de casos	Periodo entre aislados (días)	Especie	Tipo fla	Resistotipo	Porcentaje de semejanza <i>KpnI</i> -PFGE	MLST (ST)
1	H7	2	3	<i>C. jejuni</i>	Tipo 1	Cip ^R Amx ^R TCY ^R	100	ST464
2	H2	2	10	<i>C. coli</i>	Tipo 47	Cip ^R TCY ^R	82,76	ST827/ST6510 ^a
3	H7	2	0	<i>C. jejuni</i>	Tipo 13	Cip ^R	100	ST429
4	H2	4	0	<i>C. jejuni</i>	Tipo 18	Cip ^R Amx ^R TCY ^R	100	ST21
5	H2	2	0	<i>C. jejuni</i>	Tipo 1	Cip ^R Amx ^R TCY ^R	62,43	ST464/ST883
6	H2	3	9 ^b	<i>C. jejuni</i>	Tipo 4	Pansusceptible	95,65/100 ^b	ST48
7	H2	2	4	<i>C. coli</i>	Tipo 54	Cip ^R TCY ^R	96,97	ST829
8	H7	2	0	<i>C. jejuni</i>	Tipo 1	Cip ^R TCY ^R	100	ST464
9	H7	2	0	<i>C. jejuni</i>	Tipo 35	Cip ^R TCY ^R	100	ST227
10	H7	2	3	<i>C. jejuni</i>	Tipo 30	Cip ^R TCY ^R	82,75	ST523/ST6511 ^a

^a ST6510 y ST6511 han sido descritos por primera vez en este trabajo. Las secuencias y datos han sido depositados en la base de datos internacional de MLST de *Campylobacter* (<http://pubmlst.org/campylobacter/>).

^b De los 3 aislados que constituirían este posible brote, 2 de ellos se aislaron con 9 días de diferencia (95,65% de semejanza entre ellos), mientras que entre los 2 aislados con un 100% de semejanza, la diferencia de aislamiento fue de un día.

De forma rutinaria, cada cepa de *C. jejuni*/*C. coli* que es remitida a nuestro laboratorio es tipificada mediante la técnica de RFLP-PCR-*flaA*. El patrón de bandas generado se compara con los ya existentes por medio del software InfoQuest FP Software (Bio-Rad, España) mediante el índice de Dice (optimización 1% y tolerancia 1%) y a cada patrón nuevo (al menos una banda de diferencia) se le asigna un nuevo tipo *flaA*.

Para la técnica de MLST se utilizaron los primers y el programa de PCR disponible en la página web: <http://pubmlst.org/campylobacter/info/primers.shtml>, amplificándose fragmentos de los 7 genes constitutivos seleccionados para *C. jejuni*/*C. coli*: *aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt*, *uncA*. Los productos de PCR se purificaron usando el kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuenciación de los fragmentos purificados se realizó con un kit comercial (Big Dye Ready Reaction Mix version 3.1, Applied Biosystems, EE. UU.). Se asignaron los tipos de alelos correspondientes a cada secuencia de cada gen por comparación con los de la base de datos de MLST, disponibles en: <http://pubmlst.org/campylobacter/>. Los secuenciotipos (ST), combinación de los 7 alelos de cada aislado, se asignaron de igual modo de acuerdo con los resultados obtenidos tras la comparación de estos en la base de datos de MLST.

Electroforesis en gel de campo pulsante

La preparación del ADN genómico de cada aislado se realizó siguiendo el método estandarizado para *Campylobacter*²⁵. La digestión del ADN genómico se hizo utilizando la enzima *KpnI* (FastDigest® Fermentas, ThermoFisher, España). Los geles de agarosa se prepararon al 0,9% de concentración (peso/volumen) en TBE 0,5X y las condiciones de electroforesis fueron las previamente establecidas por On et al. para la enzima *KpnI*²⁶.

Los perfiles de bandas generados en la técnica de PFGE (pulsotipos) se analizan definiéndose patrones de bandas para cada aislado y se comparan con los ya existentes por medio del software InfoQuest FP Software (Bio-Rad, España), en las mismas condiciones (optimización y tolerancia) que en el caso de RFLP-PCR-*flaA*. Los árboles de semejanzas entre pulsotipos (dendrogramas) se construyen usando el método *unweighted pair group method with arithmetic mean*.

Resultados

Durante el año 2008, se recibieron 352 aislados del género *Campylobacter*, procedentes de 16 hospitales en España. De ellos, 282 fueron identificados como *C. jejuni*, y 52, como *C. coli*, mientras que en 12 aislados había coinfección de más de una

especie. De forma minoritaria se identificaron otras especies: *C. lari* (n=1), *C. fetus* sbsp. *fetus* (n=4), *C. curvus* (n=1). A todos los aislados identificados como *C. jejuni* o *C. coli* (n=334) se les realizó un antibiograma frente a 7 antimicrobianos y se tipificaron molecularmente mediante la técnica RFLP-PCR-*flaA*. Esto generó una base de datos con los valores de CMI de cada cepa (y sus perfiles de resistencia) y el tipo de patrón de bandas que se generó por la digestión del fragmento amplificado del gen *flaA* (tipo *flaA*).

Del total de cepas recibidas en el año 2008, se encontraron 51 tipos *flaA* diferentes, destacando como más abundantes: tipo *flaA* 1 (39 cepas), tipo *flaA* 54 (27 cepas), tipo *flaA* 5 (20 cepas), tipo *flaA* 4 (18 cepas), tipo *flaA* 7 (18 cepas) y tipo *flaA* 11 (17 cepas). Aunque debemos resaltar que la mayoría de los tipos *flaA* descritos solo están representados por un número muy bajo de cepas e incluso en muchos casos, por una sola cepa.

En la base de datos se realizó una búsqueda de posibles brotes no diagnosticados en base al siguiente criterio: 2 o más aislados procedentes del mismo hospital, pertenecientes a la misma especie, en los que coincidiese el tipo *flaA* y el resistotipo (máximas variaciones permitidas en la CMI de ± 1 dilución), y con fechas de aislamiento entre ellos de hasta 11 días. Siguiendo este criterio se seleccionaron 10 grupos de aislados (ver [tabla 1](#)), de los que 8 estaban compuestos por 2 aislados, mientras que los 2 restantes lo estaban por 3 y 4, respectivamente.

En nuestro estudio, el análisis de los perfiles de bandas generados mediante PFGE con la enzima *KpnI* (ejemplos de perfiles de bandas en la [figura 1](#)) reveló un porcentaje de semejanza entre aislados del 100% para los supuestos brotes 1, 3, 4, 6, 8 y 9, siendo en ellos el ST coincidente (ver [tabla 1](#)).

En todos los casos con una semejanza mayor del 95% en el perfil de PFGE el ST también era coincidente, mientras que en el caso de valores inferiores al 95% había también variaciones en los alelos MLST ([tabla 1](#)).

Discusión

Durante el periodo 1994-2003, en España se notificaron 36 brotes de campilobacteriosis en el Boletín Epidemiológico Semanal (<http://www.isciii.es/htdocs/pdf/Informedebrotesalimentarios.pdf>; consultada 8/04/2013), cifra muy baja en comparación con los 301 provocados por *Staphylococcus aureus* o los 2.568 por *Salmonella enterica* en el mismo periodo. En el año de estudio, 2008, en el Laboratorio de *Campylobacter* del Centro Nacional de Microbiología se recibió un solo brote de campilobacteriosis, causado por *C. jejuni*, con 8 casos, que fue confirmado mediante marcadores como el perfil de resistencia a antimicrobianos, RFLP-PCR-*flaA*, PFGE y MLST.

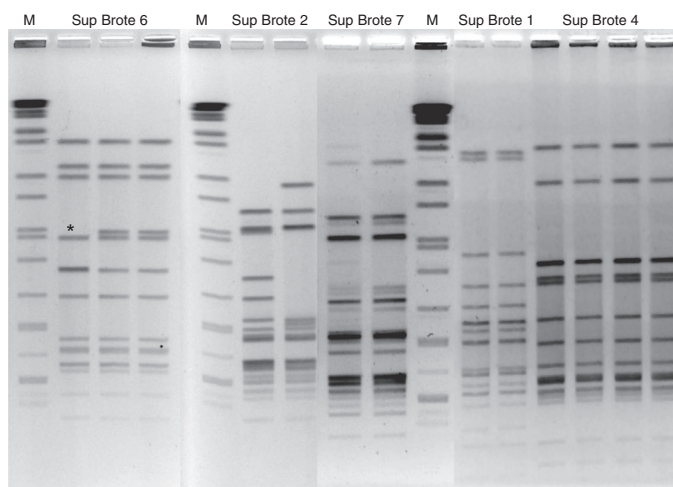


Figura 1. Composición a partir de 3 geles diferentes de electroforesis en gel de campo pulsante, donde podemos apreciar pulsotipos idénticos en algunas cepas (Supuestos Brote 1 y 4), así como otros en los que hay variación en algunas de las bandas, como en el Supuesto Brote 5, donde se ha marcado con un asterisco la banda de diferencia. También se muestra alguno como el Supuesto Brote 6, en el que se aprecian diferencias en varias bandas.

M: marcador de peso molecular (*Salmonella* serotipo Braenderup H9812, digerido con *Xba*I).

Como algún estudio ha apuntado¹⁵, es posible que haya muchos más brotes de campilobacteriosis sin diagnosticar que los notificados. Las técnicas moleculares recomendadas para la investigación de los supuestos brotes, como PFGE y MLST, son costosas y laboriosas. PFGE requiere un equipamiento que no se encuentra de forma rutinaria en los laboratorios de microbiología clínica, mientras que la técnica de MLST conlleva la realización de un alto número de PCR (7 por cepa) y de reacciones de secuenciación.

Nuestro objetivo fue intentar buscar en nuestra base de datos posibles brotes no diagnosticados, mediante el empleo de marcadores sencillos, utilizados en la mayoría de los laboratorios que trabajan con *Campylobacter* spp.

En la utilización del perfil de resistencias frente a una selección de antimicrobianos se ha tenido en cuenta que en el transcurso de un brote no debería haber variaciones en los valores de CMI entre los aislados, ya que la presión antibiótica habría sido igual para todos ellos. Aunque los pacientes hubieran recibido tratamiento antibiótico, teóricamente no habría el tiempo suficiente para que se desarrollara una resistencia de la bacteria frente al antibiótico o una variación significativa de los valores de CMI, si bien en el caso de las quinolonas, la resistencia se sabe que se desarrolla de forma muy rápida²⁷.

Para *Campylobacter*, RFLP-PCR-*flaA* es un marcador con alto poder de discriminación, como evidencian los 51 tipos *flaA* diferentes identificados entre las cepas de *Campylobacter* spp. recibidas en el año 2008. Sin embargo, tanto nuestra experiencia, como la de otros autores²⁸⁻³⁰, indica que es un marcador que permanece invariable a lo largo de un brote de campilobacteriosis.

Con los criterios establecidos se seleccionaron 10 grupos de aislados que podrían pertenecer a brotes no diagnosticados. Para ratificar microbiológicamente si los aislados de un mismo grupo podían estar epidemiológicamente relacionados y formar parte de un brote, más allá de la coincidencia en sus valores de CMI y el tipo *flaA*, se estudiaron los marcadores complementarios: i) PFGE, que es considerada de elección en el estudio de brotes de patógenos alimentarios, y ii) MLST, que, a pesar de determinar secuencias de genes constitutivos muy conservados, tiene el suficiente poder de discriminación en *Campylobacter*. Estas técnicas, teóricamente, no deberían mostrar variación en las cepas que pertenezcan a un brote.

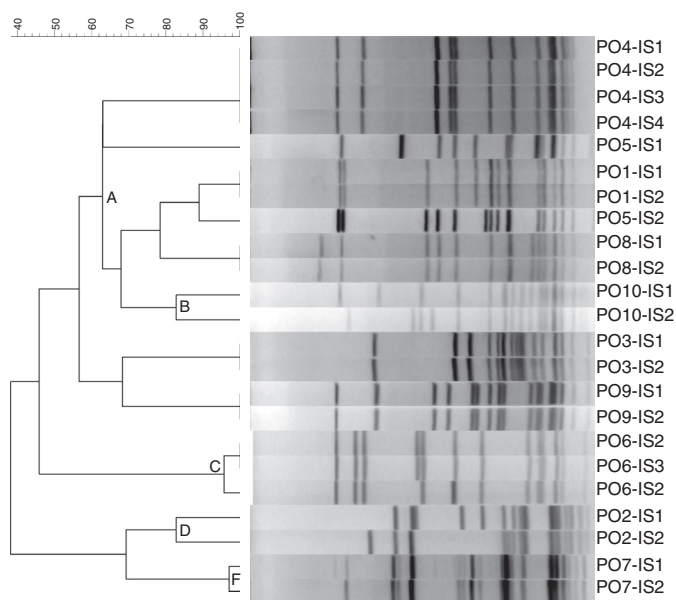


Figura 2. Dendrograma obtenido con el software Infoquest mediante la comparación de los pulsotipos generados por la enzima *Kpn*I en las distintas cepas de los supuestos brotes. A cada una de las cepas se le ha dado la nomenclatura PO*n*-IS*n*, del inglés *putative outbreak isolate*, por ejemplo: «PO1-IS1: *putative outbreak 1-isolate 1*, es decir, posible brote 1-aislado 1». Los valores de semejanza entre cepas de un supuesto brote (diferentes al 100%) señalados en el dendrograma son A: 68,65% (posible brote 5), B: 82,75% (posible brote 10), C: 95,65% (posible brote 6), D: 82,76% (posible brote 2) y F: 96,97% (posible brote 7).

Sin embargo, en el caso de PFGE, la variabilidad intrínseca de *Campylobacter* hace que pueda haber con alguna frecuencia variaciones en este marcador. Un ejemplo concreto es la observación de la variación en una banda del perfil de PFGE de un brote por movilización de un profago presente en el genoma de la cepa causante del brote³¹.

En el estudio de brotes se han utilizado de forma tradicional para PFGE los criterios elaborados por Tenover et al. en 1995¹⁰, en los que se considera que un solo evento genético (una mutación puntual) puede hacer que haya hasta 3 bandas de diferencia en el perfil de campo pulsado. Según estos criterios, dentro del contexto epidemiológico adecuado, aislados con una diferencia de hasta 6 bandas entre ellos podrían formar parte de un brote. Estos criterios deben ser considerados según las características propias del microorganismo que estemos estudiando.

En nuestro caso, siguiendo las recomendaciones de otros autores³², se ha usado la enzima *Kpn*I, que genera un número de bandas adecuado para ser suficientemente discriminatorio (más de 8 bandas, ver figura 1) y atribuye con mayor consistencia las cepas a su posible origen.

Como puede observarse en el dendrograma generado por la comparación de los pulsotipos entre los aislados del estudio (fig. 2), en 5 de los grupos la semejanza era del 100% entre los aislados de un mismo grupo, en 2 más era superior al 95%, mientras que en 3 de ellos era inferior al 85%. En los grupos 6 y 7 hay variaciones de tan solo una o 2 bandas (fig. 1), por lo que según los criterios de Tenover et al. para investigación de brotes, los aislados probablemente formaban parte de 2 brotes distintos. Incluso en el grupo 2 (fig. 1), en el que los 2 aislados tienen 3 bandas de diferencia, no se podría descartar que ambos aislados pertenecieran al mismo brote. Para confirmar y apoyar los datos obtenidos mediante PFGE se ha seguido la tendencia actual en el estudio de brotes de *Campylobacter*, que es utilizar más de una técnica de tipificación molecular además del PFGE³³, es por ello que hemos utilizado una técnica basada en la secuenciación, como es la MLST.

En todos los casos, los aislados con semejanzas en PFGE superiores al 95% poseían el mismo ST, encontrando solo variaciones entre alelos en aquellos con porcentajes inferiores. En el caso del grupo 2, ambos aislados pertenecían a diferentes ST, si bien se diferencian en un solo alelo (*tkt*), y las diferencias entre las secuencias de estos eran mínimas (un solo nucleótido). Estos datos, más la escasa diferencia entre bandas de sus pulsotipos, nos hace pensar que ambas cepas podrían pertenecer a un mismo brote.

En cualquier estudio de brotes es necesario disponer de datos epidemiológicos de los pacientes para su confirmación³⁴. En nuestro caso, no disponer de estos datos para cada aislado, salvo los nombres de los pacientes, el hospital de procedencia y la fecha de aislamiento de los aislados, hace que no se pueda confirmar al 100% que las cepas de un mismo grupo pertenecían a un brote, más allá de que fueran indistinguibles o estuvieran estrechamente relacionadas desde el punto de vista microbiológico.

Sin embargo, en 2 de los supuestos brotes (3 y 9) los pacientes en cada uno de los grupos son hermanos, por lo que parece muy claro sospechar de un brote de tipo familiar. De hecho, se estima que dentro de los brotes de campilobacteriosis, los de tipo familiar serían los más frecuentes³⁵.

Es destacable cómo 3 de los posibles brotes están constituidos por cepas multirresistentes (1, 4 y 5), lo cual es de preocupación en Salud Pública. Afortunadamente, ninguna de las cepas estudiadas era resistente a macrólidos, antibiótico de elección en las campilobacteriosis severas²⁷. Con la excepción del brote 6, constituido por cepas pansusceptibles, todos los aislados eran resistentes al menos a ciprofloxacino, lo que resalta la idea del alto porcentaje de resistencia en las cepas patógenas aisladas en España y cómo se desaconseja el uso de ciprofloxacino u otras fluoroquinolonas en el tratamiento de las campilobacteriosis, como muestran varios autores³⁶.

En conclusión, hemos visto cómo mediante el estudio de los datos obtenidos por 2 técnicas asequibles en laboratorio (resistotipo y tipo *flaA*) podemos sospechar de la presencia de posibles brotes no diagnosticados de *Campylobacter*. Más aún, estos resultados podrían ser obtenidos en poco tiempo (48 h) tras el aislamiento de las cepas. Esta alerta temprana sería de gran ayuda para la investigación epidemiológica que permitiera hacer una búsqueda de la fuente de infección y/o de otros posibles casos implicados.

De los 10 posibles brotes encontrados, 8 parecen confirmarse como tales, aunque se requieren más datos epidemiológicos. Sin duda, como se muestra en otros países, el número de brotes de campilobacteriosis está también infraestimado en España. Finalmente, consideramos que este estudio puede ayudar a comprender mejor la epidemiología y características de 2 patógenos importantes en Salud Pública, como son *C. jejuni* y *C. coli*.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Queremos agradecer especialmente a los diferentes hospitales españoles que durante el año 2008 enviaron aislados de *Campylobacter* spp. al CNM. Esta publicación hizo uso de la página web de MLST de *Campylobacter* (<http://pubmlst.org/campylobacter/>) desarrollada por Keith Jolley y alojada en la Universidad de Oxford (Jolley & Maiden 2010, BMC Bioinformatics, 11:595). El desarrollo de dicho sitio ha sido financiado por el Wellcome Trust. Agradecemos a la Unidad de Genómica del CNM por llevar a cabo la secuenciación de los alelos de la técnica MLST. También agradecemos a los doctores Silvia Herrera-León y Sergio Sánchez Prieto, de la Unidad de Enterobacterias del CNM, por su ayuda en el análisis de las secuencias de los alelos en la técnica de MLST.

Bibliografía

1. De Haan CP, Kivisto RI, Hakkinen M, Corander J, Hanninen ML. Multilocus sequence types of Finnish bovine *Campylobacter jejuni* isolates and their attribution to human infections. BMC Microbiol. 2010;10:200.
2. Toljander J, Dovarn A, Andersson Y, Ivarsson S, Lindqvist R. Public health burden due to infections by verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *Campylobacter* spp. as estimated by cost of illness and different approaches to model disability-adjusted life years. Scand J Public Health. 2012;40:294–302.
3. Moore JE, Corcoran D, Dooley JS, Fanning S, Lucey B, Matsuda M, et al. *Campylobacter*. Vet Res. 2005;36:351–82.
4. Doorduyn Y, van den Brandhof WE, van Duynhoven YT, Breukink BJ, Wagenaar JA, van Pelt W. Risk factors for indigenous *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections in The Netherlands: A case-control study. Epidemiol Infect. 2010;138:1391–404.
5. Frost JA. Current epidemiological issues in human campylobacteriosis. Symp Ser Soc Appl Microbiol. 2001:855–955.
6. Kuusi M, Nuorti JP, Hanninen ML, Koskela M, Jussila V, Kela E, et al. A large outbreak of campylobacteriosis associated with a municipal water supply in Finland. Epidemiol Infect. 2005;133:593–601.
7. Jakopanec I, Borgen K, Vold L, Lund H, Forseth T, Hannula R, et al. A large waterborne outbreak of campylobacteriosis in Norway: The need to focus on distribution system safety. BMC Infect Dis. 2008;8:128.
8. Abe T, Haga S, Yokoyama K, Watanabe N. An outbreak of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* infection via tap water. Jpn J Infect Dis. 2008;61:327.
9. Lukinmaa S, Nakari UM, Eklund M, Siitonen A. Application of molecular genetic methods in diagnostics and epidemiology of food-borne bacterial pathogens. APMIS. 2004;112:908–29.
10. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 1995;33:2233–9.
11. Rotariu O, Smith-Palmer A, Cowden J, Bessell PR, Innocent GT, Reid SW, et al. Putative household outbreaks of campylobacteriosis typically comprise single MLST genotypes. Epidemiol Infect. 2010;138:1744–7.
12. Forbes KJ, Gormley FJ, Dallas JF, Labovitiadi O, MacRae M, Owen RJ, et al. *Campylobacter* immunity and coinfection following a large outbreak in a farming community. J Clin Microbiol. 2009;47:111–6.
13. Camarda A, Newell DG, Nasti R, di Modugno G. Genotyping *Campylobacter jejuni* strains isolated from the gut and oviduct of laying hens. Avian Dis. 2000;44:907–12.
14. Scott AE, Timms AR, Connerton PL, Loc Carrillo C, Adzfa Radzum K, Connerton IF. Genome dynamics of *Campylobacter jejuni* in response to bacteriophage predation. PLoS Pathog. 2007;3:e119.
15. Gilpin B, Cornelius A, Robson B, Boxall N, Ferguson A, Nicol C, et al. Application of pulsed-field gel electrophoresis to identify potential outbreaks of campylobacteriosis in New Zealand. J Clin Microbiol. 2006;44:406–12.
16. Hum S, Quinn K, Brunner J, On SL. Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. Aust Vet J. 1997;75:827–31.
17. Lund M, Nordentoft S, Pedersen K, Madsen M. Detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples by real-time PCR. J Clin Microbiol. 2004;42:5125–32.
18. Persson S, Olsen KE. Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. J Med Microbiol. 2005;54:1043–7.
19. Gorkiewicz G, Feierl G, Schober C, Dieber F, Kofer J, Zechner R, et al. Species-specific identification of campylobacters by partial 16S rRNA gene sequencing. J Clin Microbiol. 2003;41:2537–46.
20. Hill JE, Paccagnella A, Law K, Melito PL, Woodward DL, Price L, et al. Identification of *Campylobacter* spp. and discrimination from *Helicobacter* and *Arcobacter* spp. by direct sequencing of PCR-amplified *cpn60* sequences and comparison to *cpnDB*, a chaperonin reference sequence database. J Med Microbiol. 2006;55:393–9.
21. Stelling JM, O'Brien TF. Surveillance of antimicrobial resistance: The WHONET program. Clin Infect Dis. 1997;24 Suppl 1:S157–68.
22. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. Approved guideline-Second Edition. CLSI Document M45-A2 Vol. 30 No 18. Wayne, PA: CLSI; 2010.
23. Lehtopolku M, Nakari UM, Kotilainen P, Huovinen P, Siitonen A, Hakanen AJ. Antimicrobial susceptibilities of multidrug-resistant *Campylobacter jejuni* and *C. coli* strains: In vitro activities of 20 antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54:1232–6.
24. Nachamkin I, Bohachick K, Patton CM. Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol. 1993;31:1531–6.
25. Ribot EM, Fitzgerald C, Kubota K, Swaminathan B, Barrett TJ. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. J Clin Microbiol. 2010;48:1889–94.
26. On SL, Nielsen EM, Engberg J, Madsen M. Validity of *Smal*-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by *SalI*, *KpnI*, and *BamHI* polymorphisms: Evidence of identical clones infecting humans, poultry, and cattle. Epidemiol Infect. 1998;120:231–7.
27. Luangtongkum T, Jeon B, Han J, Plummer P, Logue CM, Zhang Q. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: Emergence, transmission and persistence. Future Microbiol. 2009;4:189–200.

28. Heuvelink AE, van Heerwaarden C, Zwartkruis-Nahuis A, Tilburg JJ, Bos MH, Heilmann FG, et al. Two outbreaks of campylobacteriosis associated with the consumption of raw cows' milk. *Int J Food Microbiol.* 2009;134: 70–4.
29. Sanz JC, de los Ríos R, López-Portolés JA, Taveira JA, Simón C, Echeita MA. Description of an outbreak of *Campylobacter jejuni* gastroenteritis and molecular characterization of the implicated strain. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006;24:437–9.
30. Wardak S, Szych J, Sadkowska-Todys M. The first report on *Campylobacter coli* family outbreak detected in Poland in 2006. *Euro Surveill.* 2008; 13.
31. Barton C, Ng LK, Tyler SD, Clark CG. Temperate bacteriophages affect pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol.* 2007;45:386–91.
32. Michaud S, Menard S, Gaudreau C, Arbeit RD. Comparison of *SmaI*-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by *KpnI*: A population-based study. *J Med Microbiol.* 2001;50:1075–81.
33. Sails AD, Swaminathan B, Fields PI. Utility of multilocus sequence typing as an epidemiological tool for investigation of outbreaks of gastroenteritis caused by *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol.* 2003;41:4733–9.
34. Barrett TJ, Gerner-Smith P, Swaminathan B. Interpretation of pulsed-field gel electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance. *Foodborne Pathog Dis.* 2006;3:20–31.
35. Pires SM, Vigre H, Makela P, Hald T. Using outbreak data for source attribution of human salmonellosis and campylobacteriosis in Europe. *Foodborne Pathog Dis.* 2010;7:1351–61.
36. Cody AJ, Clarke L, Bowler IC, Dingle KE. Ciprofloxacin-resistant campylobacteriosis in the UK. *Lancet.* 1987;376:2010.

DISCUSIÓN

"En toda discusión, no es una tesis la que se defiende,
sino a uno mismo"

Paul Ambroise Valérie (1871-1945). Escritor francés

Discusión de los resultados

Existen diferentes estudios que vinculan la manipulación o consumo de carne de pollo con el riesgo de contraer campilobacteriosis en el hombre ^{388,413}. Los casos registrados de procesos entéricos causados por *C. jejuni* y *C. coli* son muy elevados, considerándose la principal gastroenteritis de origen bacteriano en los países desarrollados ^{203,388}. Si además, tenemos en cuenta que se considera que la mayoría de datos están infraestimados ^{11,325,400}, *Campylobacter* constituye un evidente riesgo para la Salud Pública. Ya que *Campylobacter* no se multiplica fuera de sus hospedadores, parecería evidente actuar en el único lugar de la cadena de transmisión donde puede multiplicarse, es decir, en las aves de consumo. Por tanto, la obtención de granjas de producción de carne de pollo libres de *Campylobacter*, o al menos, lotes de aves no colonizadas por esta bacteria cuando llegan al matadero, debería ser un objetivo en Salud Pública.

La Unión Europea en la regulación (EC) No 2160/2003 para el control de *Salmonella* y otros agentes zoonóticos causantes de infecciones alimentarias, estima que para reducir la prevalencia de *Campylobacter* se puede actuar y adoptar medidas en la etapa de producción primaria y donde sea apropiado a lo largo de la cadena alimentaria. En la presente Tesis se abordan dos etapas iniciales de producción de pollo de engorde cuya finalidad no es la producción de pollos para un consumo directo, sino la obtención de machos y hembras reproductores. Sin embargo, en ambas etapas hay una importante entrada de aves en la cadena alimentaria de, al menos, dos formas diferentes, i) selección de machos a las seis semanas de vida, donde los descartados que no cumplen con los estándares de calidad pasan al mercado como “pollos para asar”, y ii) todas las aves al final de su etapa productiva entran en la cadena alimentaria como carne de gallina y derivados cárnicos.

Las características técnicas y de bioseguridad de las granjas de abuelas (GPBFs) hacen que, teóricamente, la entrada de poblaciones de *Campylobacter* desde el ambiente exterior a las granjas sea muy limitada, y, por tanto, constituyen una oportunidad idónea para investigar cuestiones como las fuentes de colonización en granjas, el comportamiento de las poblaciones bacterianas en las aves a lo largo del tiempo, la evolución de dichas poblaciones y de sus resistencias a antimicrobianos en las mismas, etc...

Para el primer objetivo que nos propusimos, conocer qué prevalencias de *Campylobacter* en aves de consumo existen en España, dispusimos de 5 granjas de abuelas reproductoras (en dos fases: recría y producción) en las que se realizó un seguimiento de diferentes lotes de

aves, con varios muestreos en cada lote (Tabla 14. Anexo I). A su vez, se muestrearon diferentes lotes de granjas de madres reproductoras (PBFs), distribuidas por toda España.

Al inicio del estudio desconocíamos la situación de las prevalencias de *Campylobacter* en las granjas de estudio, por ello se realizaron muestreos en tres lotes de aves, cada uno de una granja diferente, con independencia de la edad de las mismas: Granjas 2, 3 y 5 (Lotes D [43 semanas], G y O [57 semanas]. Tabla 1. Artículo 4). Pudimos ver cómo, a edades cercanas al final de la vida productiva de las aves, las prevalencias dentro de los lotes eran muy elevadas: 81.2, 97.5 y 83.7%, respectivamente. Esos resultados hicieron que el plan posterior de muestreo se planificase en dos fases, dependientes de las características de producción de las aves:

- Granjas de Recría: Desde Incubadoras hasta la semana 20 de vida. Se realizaban muestreos en dos momentos muy puntuales en esta fase: i) selección de machos (5-7 semanas) ii) traslado a granjas de producción (19-20 semanas).
- Granjas de abuelas (Producción): Desde la semana 20 hasta la semana 60. Diferentes muestreos, cada semana desde la 20, hasta encontrar porcentajes de positivos de al menos un 30% y posteriormente muestreos adicionales para observar la evolución de las poblaciones de *Campylobacter*.

Pudimos observar que en la primera fase de muestreo, salvo en una ocasión que se comentará después, los lotes eran negativos a la colonización por *Campylobacter* spp. En la segunda fase, en las granjas de abuelas reproductoras, comienzan a aparecer aves positivas relativamente pronto tras el traslado. Así, como podemos ver en el artículo 1, en las dos granjas estudiadas con detalle se alcanzan prevalencias cercanas al 30% (26.5%) entre las semanas 20-30, mientras que en las edades finales, prácticamente todas las aves del lote están colonizadas por *Campylobacter* (92.7% en las dos granjas reflejadas en el artículo 1). Esto es comparable a otros estudios europeos, por ejemplo en Noruega, donde se determinó que las aves pasaban de una prevalencia del 7% en *broilers* de 32-35 días a unas prevalencias del 73% al final de la vida productiva de las aves ¹⁹¹. Es decir, que pese a las medidas de bioseguridad y características climáticas y zootécnicas que influyen en la prevalencia, cuando los lotes de aves se colonizan con *Campylobacter*, se alcanzan prevalencias altas a lo largo del tiempo, y el ave permanece colonizado durante toda su vida productiva ³⁴⁷. Esta explosividad en la colonización se refleja en nuestro estudio. Así, como vemos en la Tabla 1 del artículo 1, en tan solo una semana de vida se puede pasar de no detectar colonización, a valores del 40% (lotes B y G).

Una consecuencia de estos resultados es que observamos una relación entre la edad de las aves y el porcentaje de colonización por *Campylobacter*. En diferentes estudios llevados a cabo en *broilers*, no se detecta colonización antes de la 2^a-3^a semana de vida ^{53,368}, donde los anticuerpos maternos tendrían un efecto protector ³⁴⁶. Tras la caída de los niveles de IgG de origen materno habría un periodo donde el ave sería fácilmente colonizable, ya que aún no habría desarrollado su inmunidad adquirida ²⁶⁶. En nuestro estudio, conseguimos de forma casi general un retraso importante de la colonización (hasta las 18 semanas) en la primera etapa de producción. Este retraso se debe, en nuestra opinión, a las características de bioseguridad de las granjas de recría y a los aspectos zootécnicos (menor intervención humana en el manejo de las aves).

En la siguiente etapa de producción (PBFs), como podemos observar (Tabla 1. Artículo 4), y salvo en tres excepciones, en el primer muestreo realizado ya se alcanzaba al menos un 30% de aves colonizadas. Además, las prevalencias alcanzan valores elevados a edades mucho más tempranas que en la primera etapa de producción, por ejemplo: Lotes P-G (9 semanas: 53.3%), P-H (5 semanas: 83.3%) y P-L (10 semanas: 66.7%). Sin embargo, como muchos autores reflejan, establecer comparaciones entre granjas con características de bioseguridad y de número de aves tan heterogéneas es difícil ²¹⁴. Pero, lo que parece evidente es que, a menores medidas de seguridad, la edad de las aves deja de ser un factor determinante en la aparición de colonización, ocurriendo a edades tempranas.

Otro aspecto a considerar en nuestros resultados es que no se encontró ningún lote de aves en las granjas de abuelas que fuese negativo a *Campylobacter* en todo el periodo de vida de las aves (Tabla 14. Anexo I). En algunos casos, como en los lotes B, F y J, como vemos, se llevaron a cabo numerosos muestreos en las aves hasta encontrar una prevalencia del 30% (hasta 10 muestreos en el caso del lote F, ver Tabla 14. Anexo I). Es decir, que pese a las medidas de bioseguridad que poseen las granjas, en algún momento estas dejan de ser efectivas y se produce la colonización de las aves. Por tanto, a diferencia de *Salmonella*, que se ha conseguido eliminar de las granjas de aves de forma efectiva ²⁶⁶, necesitamos reevaluar las medidas a aplicar en el caso de *Campylobacter*. Sin embargo, un dato positivo es que si aplicásemos las medidas de bioseguridad actuales de las granjas de abuelas a las granjas de *broilers* podríamos conseguir un retraso en la colonización hasta fechas posteriores a la edad de sacrificio de las aves (5-6 semanas) y por tanto lotes libres de *Campylobacter* en matadero.

Como ya hemos comentado, solamente en un caso, que reflejamos en el artículo 2, se produce colonización por *Campylobacter* en recría, antes de las 20 semanas. En una de las dos granjas de recría se produjo a las 9 semanas, siendo en la otra a las 19 semanas. En ambos casos se produjo colonización tanto por *Campylobacter jejuni* como por *C. coli*. Mediante

muestreos de fuentes ambientales en las granjas y el uso de marcadores moleculares pudimos establecer el origen de esa colonización para la especie *C. coli*, sabiendo que un fallo en las medidas de bioseguridad provocó esa colonización temprana.

Aunque la principal especie aislada en aves de consumo es *C. jejuni*, es habitual que exista colonización también por *C. coli*. Esto se refleja en el artículo 2 de la presente Tesis, así como en diferentes estudios realizados en otros países ^{206,287,298,425,439}. En las granjas de nuestro estudio se pueden encontrar lotes colonizados exclusivamente por *C. jejuni*, como las granjas 1-3 en la primera etapa de producción (GPBFs) (2002-2005) y varias granjas de PBFs. Sin embargo, es en esta etapa de producción (PBFs), donde *C. coli* aparece en seis de los doce lotes muestreados, aun con porcentajes variables dentro de cada lote (entre un 20-100%), como se ve en la tabla 14 (Anexo I).

En un estudio europeo del año 2008, se estableció que el porcentaje de *C. jejuni* y *C. coli* en lotes de aves criados en producción convencional (de forma intensiva, al igual que en esta Tesis) era de 60.4%/39.6%, respectivamente (Informe accesible en <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1503.pdf> Último acceso 01/04/2014). Estudios posteriores en Irlanda ²⁸⁸ y Alemania ⁸, arrojan cifras de *C. jejuni*/*C. coli* de 57%/36.6% y 73.6%/23.7%, respectivamente.

Es decir, que aunque tradicionalmente se ha asociado a *C. coli* con otro hospedador como es el cerdo ¹⁷⁹, también aparece en un porcentaje no desdeñable en las aves de consumo. Diferentes estudios han mostrado que la especie *C. coli* tiene un carácter más clonal que *C. jejuni*, encontrándose clones asociados a diferentes hospedadores (pavo, ganado vacuno, etc..) ^{93,255}. En cuanto al pollo, también se han encontrado grupos relativamente homogéneos de cepas de *C. coli*, aunque sin un carácter tan clonal como en las cepas de origen porcino ²⁰⁹. Pero no se puede de ningún modo descartar que existan también clones de *C. coli* especialmente adaptados al intestino del pollo. En algunos casos colonizando de forma exclusiva a las aves, y en otros casos, como se reflejaría en algunos de los lotes estudiados en esta Tesis, compartiendo el mismo nicho ecológico con *C. jejuni*. Este extremo se investiga en el artículo 3, que se comentará posteriormente.

Algunos estudios recientes indican que el intercambio genético entre ambas especies es frecuente, y que incluso, en algunos casos, ambas estarían convergiendo, sobre todo por adquisición de alelos de *C. jejuni* por parte de *C. coli*. Esto se debería al desarrollo de prácticas de ganadería que hacen que los hospedadores de ambas especies convivan ³⁶⁷. En el caso de esta Tesis, la identificación de especies se llevó a cabo inicialmente mediante pruebas bioquímicas (catalasa, oxidasa, hipurato). Sin embargo, el test de hidrólisis del hipurato,

como otros autores han indicado ^{264,370}, puede producir falsos positivos y negativos, de ahí que hayamos utilizado varias PCRs para una correcta identificación de especies en muchos de los lotes estudiados (ver sección de Material y Métodos de los diferentes artículos publicados).

Respecto a las fuentes de colonización, debemos tener en cuenta que las granjas de abuelas reproductoras, gracias al sistema de producción, y a las características de bioseguridad, deberían limitar en gran medida el número de fuentes potenciales de colonización. Como se ha comentado en el artículo 1, se realizaron muestreos ambientales exhaustivos en los periodos de vaciado sanitario de las granjas, es decir en el periodo en que la granja no está ocupada por los animales (10-12 semanas), mientras se acondiciona para la llegada de un nuevo lote de aves. Aunque en el artículo 1 únicamente comentamos el caso de dos granjas de GPBF, el tipo de muestreo realizado se puede hacer extensivo al resto de granjas de ese periodo de producción. Es destacable que pese a estos muestreos y que, aunque se fueron introduciendo variaciones en la composición de los mismos para obtener mayor rendimiento, solo hemos aislado bacterias viables en dos ocasiones: En el agua de bebida de las aves en las granjas de recría (Artículo 2) y en el foso de desinfección de las ruedas de los camiones que entran o salen de las granjas (Artículo 1).

Este bajo rendimiento en la obtención de muestras ambientales positivas ha sido descrito por otros autores ³²³, observando un baja recuperación de bacterias viables. *Campylobacter* no es capaz de multiplicarse fuera de un hospedador animal y posee una mala respuesta al estrés ambiental ¹⁸⁰.

Si los muestreos se hubieran realizado en el periodo de ocupación de las granjas, la mayoría de muestras ambientales del interior de las granjas hubieran sido positivas, ya que, mientras la bacteria coloniza las aves, se puede diseminar por toda la granja por medio del agua de bebida ^{106,266}, alimento ^{214,371}, aerosoles ^{34,214,288} y por los insectos que hubiera en la granja ^{374,389}. Esto no solo afecta al ambiente dentro de las naves donde se encuentran las aves, si no al exterior de las granjas, no detectándose *Campylobacter* en el exterior hasta que el lote no es colonizado ³⁴.

En los diferentes estudios de factores de riesgo asociados a la colonización de aves por parte de *Campylobacter*, las actividades de intervención de los operarios en las granjas, y más concretamente el aclarado (eliminación del exceso de población en la granja), se identifican como los principales factores de riesgo ^{5,10,106,274,287,420}. En las granjas de nuestro estudio hay tres intervenciones humanas principales en las granjas: i) traslado de pollitos de 1 día de incubadoras a granjas, ii) selección de machos en recría a las 5-6 semanas y iii) traslado de

granjas de cría a producción. Salvo en el caso comentado en el artículo 2, y en el que identificamos de forma clara una fuente de infección, los muestreos en cría fueron negativos, por lo que podemos descartar de forma más o menos general las dos primeras actividades mencionadas. Más aún, aunque no mencionado en los artículos publicados y recogidos en esta Tesis, además de las muestras tomadas comentadas en el artículo 1, se hicieron muestreos exhaustivos de los camiones encargados de los traslados: cabina del conductor, ruedas, remolque, botas y manos del conductor...así como de los operarios que intervinieron en los traslados (manos, botas, monos de trabajo, vestuarios, felpudos con desinfectante en la entrada de las naves, etc..) siendo en todos los casos negativos a *Campylobacter*. También fueron negativas todas las muestras tomadas en incubadoras: restos de plumón, cáscaras, cajas de transporte...

Centrándonos en las fuentes de infección identificadas (Artículos 1 y 2), en ambos casos la matriz donde se ha aislado la bacteria es el agua. El agua no es un medio ideal para *Campylobacter*, debido a las condiciones de tensión de oxígeno, falta de nutrientes y la baja temperatura ²⁶⁶. Sin embargo, en ambos casos, la contaminación ha sido masiva, encontrándose gran número de bacterias viables.

En ambos casos se hace evidente la revisión de las dosis de desinfectante usados para evitar colonización por *Campylobacter*. En el caso del agua de bebida, la concentración de cloro de 2-3 ppm pese a ser la recomendada, no fue efectiva. Este hecho ha sido observado previamente ³⁸⁶ y en nuestro caso, tras aumentar la concentración final de cloro se logró que no se detectase en el agua de bebida la bacteria en los diferentes muestreos llevados a cabo posteriormente. En el caso de las cepas aisladas en el foso de desinfección de ruedas de los camiones, las cepas aisladas resistieron la presencia de compuestos fenólicos que se añaden como desinfectante. Se revisó la concentración tras estos hechos, no volviéndose a detectar la bacteria en agua de bebida.

Las muestras tomadas del interior de las naves durante el periodo de vaciado sanitario fueron siempre negativas. Las muestras de superficie (polvo, restos de comida y cama) poseen muy baja humedad, lo que dificulta la supervivencia de *Campylobacter* ²⁹³. Los insectos, muy frecuentes en las granjas (moscas y alfitobios), como algunos autores han comentado ^{374,389} actúan más a modo de vector de colonización una vez que la bacteria ha entrado en la granja, sin que se detecte *Campylobacter* en los periodos de vaciado sanitario ^{151,168}, como es en nuestro caso. La supervivencia de la bacteria una vez que el insecto está muerto es de hasta 72 horas en el mejor de los casos ³⁸⁹, mientras que los periodos de vaciado sanitario duran entre 10-12 semanas.

Para la comparación de las cepas aisladas en muestras ambientales con las aisladas en muestras cloacales de aves, necesitamos utilizar herramientas que permitan caracterizar las cepas y comparar esas características para poder establecer posibles relaciones epidemiológicas entre ellas. Por otra parte, ante la detección de la misma cepa en aves y una fuente ambiental, surge la duda de la dirección de colonización, es decir, ¿la bacteria presente en el ambiente tiene como origen las aves que contaminan el ambiente? o, ¿las aves se colonizan por una bacteria ambiental? Las herramientas más utilizadas en estos estudios comparativos son los marcadores moleculares, siendo la técnica de PFGE la más empleada en el estudio de fuentes de infección ^{252,300,326,369}. En nuestro caso además de PFGE con dos enzimas de restricción, hemos usado dos marcadores moleculares más, como son el RFLP-PCR del gen *flaA* y MLST.

En el caso de las granjas de recría (Artículo 2), con estos marcadores moleculares pudimos caracterizar en el agua de bebida de la granja dos cepas diferentes, de genotipos: *fla1-Sma1-Kpn1-ST1682* (*C. jejuni*) y *fla2-Sma2-Kpn2-ST827* (*C. coli*). Este genotipo de *C. coli* se encontró de igual modo en las aves de las dos granjas de recría a las que se abastecía con ese agua de bebida. El genotipo de *C. jejuni* obtenido en agua, por contra, no se aisló en ninguna de las muestras cloacales tomadas a las aves. La disposición del sistema de conducción de agua y al tratarse de un sistema cerrado desde el pozo hasta los bebederos, nos induce a pensar que el pozo es el origen de la infección. Las cepas de *C. coli* deberían moverse contracorriente desde los bebederos hasta el pozo, situación bastante improbable.

En cuanto a los 3 genotipos diferentes de *C. jejuni* que detectamos en las aves, pero no en el agua de bebida (Tabla 1. Artículo 2), es difícil saber su origen. La ausencia de otras muestras ambientales positivas, así como las medidas de bioseguridad nos hacen sugerir que es también el agua de bebida el origen. La no detección de estas cepas en el agua no supone que no estén presentes, ya que, como hemos comentado, el rendimiento en la recuperación de cepas de *Campylobacter* desde fuentes ambientales es muy bajo ³²⁴. La supervivencia en el agua, pese a las condiciones adversas que supone puede conseguirse de, al menos tres formas diferentes: i) formación de un estado VBNC, aunque el potencial colonizador de estas formas está en entredicho ²¹⁴, ii) cepas que están especialmente adaptadas al ambiente acuático ²⁷⁶, aunque su potencial colonizador también sería discutible y iii) supervivencia dentro de biofilms y protozoos ^{380,402}.

Esta última posibilidad es bastante probable, no solo por el hecho de que se conozca que en *Legionella pneumophila* y *Mycobacterium* spp. la virulencia de estas bacterias aumente tras cocultivo con protozoos ²⁰, sino porque se conoce que *C. jejuni* soporta hasta 50 veces mayores niveles de cloro si está internalizada por protozoos ²⁰².

La técnica de MLST, que tiene un valor en estudios poblacionales, ha demostrado la asociación de determinados STs con hospedadores concretos para la especie *C. coli* ^{255,364}. Sin embargo, el ST encontrado en la cepa de *C. coli* identificada en el agua de bebida, ST827, pertenece al complejo clonal más numeroso dentro de *C. coli* (CC ST-828) y además no posee una especial asociación frente a unos u otros hospedadores, habiéndose encontrado en ganado vacuno, ovino, pato, cerdo, pollo, pero principalmente, en aislados clínicos obtenidos de campilobacteriosis ³⁶⁶. No podemos, por tanto, afirmar que sea un grupo de cepas especialmente adaptado al medio acuático o al pollo.

Es importante utilizar más de un marcador molecular en los estudios epidemiológicos como serían los de comparación de cepas o de estudio de fuentes de colonización, y en el artículo 2 tenemos un buen ejemplo de ello. Como vimos, en el agua de bebida se aislaron dos cepas diferentes, la cepa perteneciente a la especie *C. jejuni* coincide para el marcador RFLP-PCR del gen *flaA* con una población de *C. jejuni* aislada en las aves de la granja. Si únicamente utilizásemos dicho marcador diríamos que ambos grupos de cepas (agua y aves) pertenecen a la misma población y que por tanto el origen de las cepas de *C. jejuni* *fla1* es el agua de bebida. Sin embargo, como podemos ver (Tabla 1. Artículo 2) el resto de marcadores moleculares no son coincidentes, siendo la semejanza en la combinación de pulsotipos y tipo *fla* inferior al 60%.

En el artículo 1, cuando comparamos las cepas de *C. jejuni* aisladas en el ambiente exterior de las granjas (genotipos 15 y 17) con las cepas aisladas de las aves presentes en la granja, reveló que el genotipo 15 ya se había detectado en las aves de esa granja tres años antes. Por tanto surge la duda que siempre aparece en el estudio de fuentes ambientales: la dirección de la colonización. Para teorizar la dirección de colonización nos hemos apoyado en la comparación de resistotipos (perfil de resistencias a antimicrobianos), ya que observamos que las cepas de origen aviar son resistentes a quinolonas o incluso a quinolonas y amoxicilina (-lactámico). La cepa aislada en el exterior, por contra, es sensible a todos los antimicrobianos testados. Sabemos que las bacterias pueden perder elementos genéticos externos al cromosoma, como son los plásmidos, si desaparece la presión antibiótica que hace necesaria esa resistencia ^{12,342}. Sin embargo, para las quinolonas, en el caso de *Campylobacter*, el principal mecanismo de resistencia son las mutaciones en la región QRDR del gen *gyrA*, sin que se conozcan mecanismos de tipo plasmídico. Se conoce además, que la mutación Thr86Ile, que es la más prevalente en *C. jejuni* y *C. coli* proporciona una mayor capacidad de adaptación y de colonización a las aves que la portan en su cromosoma ²³³. Estos hechos hacen inclinarnos en pensar que el exterior de la granja es el origen más que el destino de las cepas. La aplicación del perfil de resistencias (resistotipo) en estudios

poblacionales ha sido utilizado también por algún autor con éxito ²⁵². La ausencia de otras muestras positivas de fuentes ambientales dificulta establecer un origen más certero de las cepas presentes en el agua.

Como hemos visto, el rendimiento de los métodos tradicionales de enriquecimiento a partir de muestras ambientales es escaso, salvo que la contaminación sea masiva, como se refleja en los artículos 1 y 2. Por tanto, se requieren métodos alternativos de investigación: i) cocultivo de muestras ambientales con amebas y protozoos, principalmente *Acanthamoeba castellanii* y *Tetrahymena pyriformis*, conocidos hospedadores de *Campylobacter* ³⁸⁰ con los que se podría recuperar formas cultivables y ii) detección del material genético de *Campylobacter* ³²⁴, por ejemplo del ARN mensajero, lo que indicaría una viabilidad de la bacterias presentes (mediante RT-qPCR).

Otro aspecto que hemos estudiado en las granjas de abuelas reproductoras es el comportamiento de las poblaciones de *C. jejuni* y *C. coli* a lo largo de la vida productiva de los lotes de aves, es decir, la dinámica de las poblaciones bacterianas. El estudio de las poblaciones nos puede aportar datos sobre capacidad colonizadora de las cepas, estabilidad de los resultados de los marcadores moleculares, con aparición de subtipos derivados de un tipo principal, posibles fuentes de infección y estacionalidad de la colonización por *Campylobacter*. Un aspecto importante a tener en cuenta es que, de forma general, como ya se ha comentado, la estructura de las poblaciones de *Campylobacter* aisladas en aves de consumo es débilmente clonal ^{71,423}. Esto significa que a la hora de comparar poblaciones mediante PFGE debemos tener un criterio diferente a los usados de forma habitual en otros estudios (Criterios de Tenover, por ejemplo). A tal efecto, como se expone en el anexo II, hemos definido un valor de *cut-off* de forma experimental para nuestros estudios comparativos con PFGE.

Para estudiar las poblaciones de *Campylobacter* se escogieron dos granjas de GPBF representativas de lo que ocurre de forma general en esta etapa de producción, reflejándose en el artículo 1. En una de ellas (Granja 1), se observa variedad de genotipos de *C. jejuni*, siendo la mayoría de ellos, además, transitorios en los lotes de aves. En la denominada Granja 2 de dicho artículo, (se denominó de esa forma a modo de simplificación, aunque realmente corresponde a la Granja 3 de nuestro estudio -Tabla 14. Anexo I-), hay poca variedad de genotipos siendo la mayoría de ellos persistentes entre muestreos. Aunque como se refleja en la literatura científica lo más habitual es la presencia de numerosos genotipos transitorios en las aves ^{34,160,252,369}, en nuestro estudio podemos encontrar tanto genotipos transitorios como persistentes.

Con un poco más de detalle, podemos ver como en el primer muestreo del lote A (Granja 1) a las 28 semanas detectamos hasta 5 genotipos distintos en las aves, de ellos, cuatro (genotipos 1, 2, 10 y 13) se mantendrán durante la vida del lote (Figura 3. Artículo 1). Como se ha comentado, cuando termina la vida productiva de un lote se produce un periodo de vaciado sanitario de 10-12 semanas en el que se retiran comederos, bebederos, cama y restos de comida en las naves, se limpia y desinfecta y se deja ese tiempo sin ocupar por animales. Los muestreos ambientales dentro de las granjas en esos periodos fueron negativos en todos los casos, por lo que no podemos conocer cuál es el reservorio del genotipo 2 en la Granja 1 y que se detecta en el lote siguiente. De forma similar ocurre en la Granja 3 con los genotipos 2 y 15.

Como vemos en la figura 3 del artículo 1, en el tercer muestreo del lote A se llegan a detectar hasta 10 genotipos diferentes, es decir, según avanza el tiempo se produce, o bien entrada de cepas, aunque no hemos podido saber su origen, o bien hay detección de genotipos que se encontraban en muy bajo número en los muestreos anteriores. Esta última posibilidad es más plausible, ya que las condiciones de bioseguridad limitan las fuentes de colonización existentes. Esta situación de aumento de genotipos con el tiempo se ha observado en otros estudios ^{58,169}.

La Granja 1 de abuelas reproductoras es un ejemplo de competición entre poblaciones de *C. jejuni* por colonizar el nicho ecológico. En ella, finalmente, solo un genotipo, (genotipo 2) consigue ocupar este nicho y desplazar al resto de poblaciones. Que este genotipo aparezca además en ambas granjas nos sugiere una fuente de colonización común a ambas: alimentación, personal de la granja, transporte de aves... Sin embargo, entre las medidas de bioseguridad de las granjas se indica que no se comparte personal o material entre las distintas granjas, por lo que esa posibilidad estaría descartada. El agua de bebida, a diferencia de las granjas de cría no proviene de un pozo, sino de la red general de abastecimiento. Tampoco se consiguió detectar ese genotipo en las jaulas de transporte o en los camiones u operarios encargados de los traslados de aves. Por tanto, el origen del genotipo 2 es de momento, desconocido.

En la granja 1 existen genotipos (genotipos 5, 10 y 13) con marcadores moleculares que muestran pequeñas variaciones en la disposición de bandas (Figura 1. Artículo 1), siendo el marcador con mayor variación, RFLP-PCR del gen *flaA*. Que haya mayor variación en el tipo *flaA* tiene bastante lógica, ya que se ha encontrado que todas las estructuras superficiales de la bacteria como la cápsula, flagelo, LOS, etc., participan en la evasión inmunitaria del ave. La evasión de la inmunidad se conseguiría mediante variaciones en estas estructuras antigénicas posibilitando una mayor colonización ⁴²⁸. Al igual que comentamos en el estudio

de las fuentes de colonización, no podemos utilizar un solo marcador molecular como sería el tipo fla. En este caso, nos indicaría como diferentes, poblaciones que en realidad pertenecen al mismo genotipo, como por ejemplo en el genotipo 13, o indicaría como pertenecientes a la misma población cepas que en realidad no lo son (de igual modo que ocurría en el artículo 2 con las cepas de *C. jejuni* fla1), como cepas de los genotipos 10 y 13. En la mayoría de estudios ^{89,160} se encuentran genotipos con variaciones (presencia de subtipos) lo que indicaría, según estos autores, un proceso de adaptación al hospedador. En nuestro caso, la presencia de genotipos muy estables en sus perfiles de marcadores moleculares posiblemente indica una adaptación ya completada, no un proceso de adaptación. Serían necesarios estudios de infección experimental con varios de estos genotipos para establecer si este extremo es cierto.

El aumento del número de genotipos en las aves se ha encontrado dependiente de la estacionalidad ²⁰⁶, concretamente con picos de entrada de cepas en meses de verano, debido al aumento de ingesta de agua, apertura de ventilación en las granjas, etc...Algún estudio señala que, en general, habría un genotipo dominante en las aves que se iría sustituyendo por otros, diferentes, según la época del año. Esto reflejaría diferentes fuentes de colonización según la época del año ²⁵². En nuestro estudio la aparición de aves colonizadas no depende de la época del año (Tabla 1. Artículo 1), sino que, como ya hemos reflejado es más dependiente de la edad de las aves. En cuanto a la diversidad de genotipos y estacionalidad, salvo en el lote A, en el resto de lotes de las dos granjas aparecen 1-2 genotipos, independientemente de la época del año, lo que contradice alguno de estos estudios previos. Probablemente, las medidas de bioseguridad limitan el efecto de fuentes externas de colonización más relacionadas con la estacionalidad.

Como podemos inferir del estudio de las fuentes de colonización de los artículos 1 y 2, en ambos casos fuimos capaces de aislar cepas en el ambiente que no se detectaron antes o después en las aves: Genotipo 17 y fla1-Sma1-Kpn1-ST 1682. El hecho de no detectar estas cepas en las aves a pesar del número de muestras cloacales analizadas nos indica que con mucha probabilidad son cepas "no colonizadoras" o "ambientales". En el caso de la cepa ST1682, no disponemos de datos en la base de datos pública de MLST de otros aislamientos de esa cepa para poder asociarla a algún hospedador específico: aves silvestres, otros mamíferos,...ya que sabemos de la existencia de cepas especialmente adaptadas a hospedadores muy concretos ^{364,416}. De igual modo, conocemos de la existencia de cepas especialmente adaptadas al ambiente acuático, sin que sean capaces de colonizar las aves de consumo ²⁷⁶, pero con los datos disponibles no podemos obtener alguna conclusión de ese tipo.

Un mejor conocimiento de las especies de *Campylobacter* en las granjas, de su prevalencia y de los genotipos existentes en las granjas es de gran ayuda en el intento de conseguir lotes libres de *Campylobacter* para el consumidor. No actuaríamos igual ante la detección de cepas persistentes y colonizadoras que frente a cepas que sabemos son transitorias o incluso no colonizadoras. Por otra parte, sabemos por diferentes estudios epidemiológicos^{388,413}, que la principal fuente de infección en las campilobacteriosis es el consumo o manipulación de carne de pollo contaminada con *Campylobacter*. Ahora bien, nos podemos plantear la siguiente cuestión: ¿son todas las cepas de *C. jejuni* o *C. coli* que aislamos en el pollo patógenas para el hombre? Para conocer este dato podemos llevar a cabo estudios de patogenicidad y virulencia, o bien mediante comparación de diferentes marcadores moleculares detectar líneas clonales comunes entre cepas de origen clínico y aviar.

Como ya hemos comentado anteriormente, en los estudios epidemiológicos con *Campylobacter jejuni* existe el hándicap de que son generalmente poblaciones con poca clonalidad, frecuentes intercambios genéticos entre cepas y reordenamientos de zonas del genoma^{133,285}, así como cambios de fase en algunos genes^{143,391}. Por el contrario, para *C. coli* se atribuye una mayor estabilidad genómica y un mayor carácter de clonalidad^{102,255}. Esto como ya hemos reflejado, hace que se asocien diferentes clones de esta especie con hospedadores determinados^{255,358,363} y que la búsqueda de líneas clonales comunes debiera ser, teóricamente, más sencilla para la especie *C. coli*.

Esta búsqueda de líneas o grupos clonales comunes entre cepas de origen aviar y clínico se aborda en el artículo 3. Se partió de la colección de cepas de *Campylobacter* de origen clínico recibidas en el Servicio de Enterobacterias del CNM durante el periodo 2002-2007. De forma rutinaria, se realiza una confirmación de la especie mediante PCR, un antibiograma por E-test frente a una serie de antimicrobianos: ácido nalidíxico, ciprofloxacino, eritromicina, gentamicina, cloranfenicol, tetraciclina, amoxocilina y amoxicilina más ácido clavulánico, y la tipificación mediante RFLP-PCR del gen *flaA*. Salvo casos de investigación de brotes, no se realiza rutinariamente la técnica de PFGE o MLST.

Por la experiencia que teníamos con las cepas de origen aviar, el marcador *flaA* no se debía usar de forma exclusiva para estudios epidemiológicos, aunque también conocíamos que era un marcador estable y válido para iniciar estudios epidemiológicos (Artículo Adicional 2).

En el periodo 2002-2007, como se refleja en el artículo 3, para las cepas de origen clínico se detectaron 95 perfiles diferentes de este marcador dentro de 1265 cepas de *C. jejuni* y 51 perfiles para 332 cepas de *C. coli*. Sin embargo, dentro de esta variabilidad de perfiles, encontramos uno de ellos (*fla* 36 según la base de datos de cepas de origen clínico) casi

exclusivamente en la especie *C. coli* y con una prevalencia destacable en ella: 13.55% de los aislados de *C. coli* eran fla 36 (n=46).

Este tipo fla 36 se correspondía con el que denominamos fla 2 en nuestras cepas de origen aviar y que ya describíamos en el agua de bebida de las dos granjas de recría y las aves de dichas granjas (Artículo 2), coincidiendo además en que eran de la especie *C. coli*. Dado que por nuestra experiencia previa sabíamos que no podíamos tomar una decisión sobre la pertenencia a la misma población solo con datos de especie y tipo fla (Artículos 1 y 2), realizamos una batería de marcadores moleculares (SVR-*flaA*, PFGE y MLST) para caracterizar y comparar las cepas de ambos orígenes (aviar y clínico). De manera adicional y dada la ayuda que nos proporcionó en anteriores estudios (Artículo 1), se incluyó el resistotipo como marcador adicional.

Se escogieron nueve cepas de origen aviar, tanto del agua de bebida como de las dos granjas (muestreos en recría -Artículo 2- y en producción), todas ellas por haber mostrados ligeras variaciones en los pulsotipos. Una de estas cepas, perteneciente al lote M (Tabla 14. Anexo I) se identificó como perteneciente a la especie *C. jejuni*.

La comparación de los pulsotipos de forma conjunta y con el valor de *cut-off* ya predeterminado del 85% (Anexo II), arrojó como resultado la formación de un *cluster* de 41 cepas que incluía todos los aislados de origen aviar, con la excepción del identificado como *C. jejuni*. Es decir, encontramos una población de cepas de *C. coli* diseminada en España, ya que los hospitales de procedencia eran de distintas CCAAs, con una estabilidad genómica muy alta (sin cambios en el pulsotipo que reduzcan su semejanza en menos de un 85%, en el periodo 2002-2007).

Los resultados obtenidos por los métodos de secuenciación (SVR-*flaA* y MLST) se compararon con los obtenidos por PFGE y se obtuvo un *cluster* de menor tamaño (35 cepas frente a las 41 por PFGE) que incluía las cepas de origen aviar. Esta variación se debe principalmente a la variabilidad observada en el marcador SVR-*flaA*, donde para un solo perfil de bandas se obtuvieron hasta 10 alelos diferentes. Sin embargo, al traducir la secuencia de ADN a aminoácidos, se obtienen dos péptidos diferentes, que se diferencian en un solo aminoácido.

En cuanto al perfil de resistencias (resistotipo), se encontró variación, existiendo cepas Pansusceptibles como multiresistentes (más de tres antimicrobianos). Esta variación podría deberse a la diferente presión antibiótica de las cepas en origen. Sin embargo, es significativo el hecho de que la mayoría de cepas incluidas en el *cluster* de cepas aviares y origen humano son resistentes a tetraciclina. La resistencia a tetraciclina, como veremos posteriormente, está

ligada a la especie *C. coli*, se cree que debido al uso de este antibiótico en la cría de cerdo ²²⁹, que es el hospedador habitual de *C. coli* ¹⁷⁹. Es también destacable la resistencia a quinolonas (ciprofloxacino) que como veremos posteriormente, se encuentra en porcentajes elevados dentro de *C. coli* y *C. jejuni*.

Todas las cepas agrupadas en la comparación de los pulsotipos pertenecían al ST-827, con la excepción de un aislado que pertenecía al ST-1173 (un solo alelo de diferencia entre ambos y solamente en un nucleótido entre los alelos). Estos datos de MLST no nos ayudan a asignar la cepa a un hospedador concreto, puesto que como ya comentamos con respecto al artículo 2, el secuenciotipo 827 pertenece a un complejo clonal muy numeroso en *C. coli* que incluye aislados de diferentes hospedadores y países. El propio ST827 ha sido descrito en cepas de origen humano, cerdo y pollo ³⁸³, pero siendo el más frecuente dentro de las cepas de origen humano ³⁶⁶. Al no disponer de otras cepas procedentes de cerdo, pavo, ganado vacuno, etc., para comparar sus marcadores moleculares, no podemos afirmar con rotundidad que esta línea clonal identificada sea un clon "aviar". Sin embargo, varios estudios apoyarían esta idea de un clon "aviar" y patógeno para el hombre. En primer lugar, la técnica de MLST define secuenciotipos y complejos clonales de cepas, que, por definición corresponderían a un origen clonal común ⁹⁴, pero algunos autores ^{77,398} han encontrado que es posible encontrar diferentes grupos clonales dentro de un mismo complejo clonal e incluso dentro de un mismo secuenciotipo. En segundo lugar, estudios realizados con MLST extendido (con 9 y 16 alelos en vez del tradicional que utiliza 7) y hibridación genómica han mostrado que las cepas de *C. coli* procedentes de ganado vacuno y cerdo, forman grupos homogéneos donde no hay presencia de cepas aisladas de humanos ²⁰⁹. Solamente se encuentran coexistencia de cepas de animales de abasto y de humanos en los grupos formados por cepas procedentes de pavo y de pollo.

Por tanto, la posibilidad de que en nuestro estudio estemos ante una línea clonal de origen aviar patógena para el hombre es bastante plausible. Esta idea se apoya también en otros estudios que confirman que las campilobacteriosis causadas por *C. coli* no se asocian al consumo de cerdo, siendo la carne de pollo la fuente más probable de infección de *C. coli* para el hombre ^{383,427}. En este sentido es destacable que sea la primera vez que se describe y establece una línea clonal de *Campylobacter* en España.

En Salud Pública, además de los aspectos relacionados con la prevalencia de un patógeno en la cadena alimentaria y la virulencia del mismo, es muy importante conocer otro aspecto como es las resistencias que posee frente a diferentes grupos de antimicrobianos. Ese va a ser, por tanto, el segundo gran objetivo de la presente Tesis, es decir, ¿Cómo se comportan las cepas de *Campylobacter* aisladas en pollo de engorde respecto a diferentes grupos de

antimicrobianos? Una vez caracterizadas las poblaciones de *C. jejuni* y *C. coli* que se aíslan en las dos etapas del estudio y sabiendo que existe, al menos, un grupo clonal compartido entre las aves y pacientes humanos, necesitamos conocer la situación de las resistencias a antimicrobianos de estas cepas. ¿Por qué es importante conocer estos datos? porque ante determinados casos de campilobacteriosis (pacientes ancianos, niños pequeños, embarazadas, o bien casos graves de campilobacteriosis) se requiere un tratamiento antibiótico. Conociendo la situación de las resistencias evitaríamos fallos terapéuticos y también la perpetuación de cepas resistentes, por eliminación de la competencia con cepas sensibles. Pero no solo es importante monitorizar las resistencias en *Campylobacter* por motivos terapéuticos, sino también porque la diseminación de cepas resistentes en el ambiente puede hacer que se transmitan algunos determinantes de resistencia a otras cepas o incluso a otras especies bacterianas. Esto es más evidente en el caso de determinantes de resistencia alojados en elementos genéticos móviles (integrones, plásmidos,...)

En la presente Tesis hemos considerado importante estudiar no solo los porcentajes de resistencia en las cepas de *Campylobacter*, sino también los mecanismos que utilizan para evitar la acción del antibiótico. Conocer los determinantes de resistencia, la base genética de los mismos, es importante no solo para combatir la presencia de poblaciones resistentes, sino también para comprender las relaciones entre las poblaciones resistentes ⁴²⁹.

Al igual que con la prevalencia de *Campylobacter* spp. en granjas, los porcentajes de resistencias (prevalencia de las resistencias) va a ser también variable entre países e incluso dentro de un mismo país: diferencias en muestreo, aislamiento, métodos de laboratorio e incluso valores de corte para definir resistencia o sensibilidad ¹⁴⁷.

Para este estudio se han escogido una representación de antibióticos de aquellas familias más importantes: ácido nalidíxico y ciprofloxacino (quinolonas), amoxicilina y amoxicilina más ácido clavulánico (-lactámicos), tetraciclina (tetraciclinas), eritromicina (macrólidos), gentamicina (aminoglicósidos), cloranfenicol (fenicoles). Obviamente, no se han incluido algunos grupos de antibióticos sobre los que *Campylobacter* es resistente de forma intrínseca, como rifampicina, vancomicina, bacitracina, novobiocina, estreptogramina B, entre otros ²²⁹.

Se han investigado las dos etapas de producción de carne de pollo ya comentadas anteriormente (GPBFs y PBFs). En ambas etapas, hemos escogido aquellos muestreos que al menos tuvieran un 30% de prevalencia, asegurándonos un número muy representativo de cepas: 805 (697 *C. jejuni* y 108 *C. coli*). Además, aunque la primera etapa de producción todas las granjas se encuentran en un radio de 30 kms², al utilizar las granjas de reproductoras nos

aseguramos una representatividad de todo el territorio nacional, ya que se encuentran en diferentes CCAAs.

Como ya se comentó en el apartado 7 de la Introducción, en la Unión Europea se prohíbe el uso de antimicrobianos como promotores de crecimiento, permitiéndose el uso solo de un modo terapéutico ³⁵². Es importante resaltar que durante el periodo de muestreo de las granjas no hay registrado uso terapéutico de ninguno de estos antibióticos investigados en la primera etapa de producción (GPBFs).

Hemos querido presentar los resultados de resistencias de una forma secuencial, es decir, en primer lugar resultados de forma global, con datos conjuntos de las dos etapas de producción; posteriormente resultados por etapa de producción y finalmente por especie (*C. jejuni* o *C. coli*) y etapa de producción de forma conjunta (Artículo 4).

Debido al alto número de cepas a investigar, se usó el método de difusión en disco, más económico que otros métodos disponibles y que, aunque no proporciona un valor de CMI directo, sí permite discriminar entre cepas resistentes y sensibles dando resultados comparables a los obtenidos con E-test o dilución en agar ²¹⁷. Es además un método aceptado por el CLSI y otros organismos como el EUCAST.

Analizando los resultados de forma global, como podemos ver en la tabla 2 del artículo 4, los valores de resistencia más elevados son para las quinolonas, con un 74.9 y un 73.9% frente a ácido nalidíxico y ciprofloxacino respectivamente. Son valores elevados de resistencia, aunque menores que los obtenidos en nuestro país en estudios previos en matadero: 99% ³⁴³ y 95.45% ²⁵⁰. Si bien no son datos obtenidos en la misma etapa de producción, pensamos que este es un hecho destacable, que en un periodo de 10 años los porcentajes promedio hayan descendido en casi un 25%. Si comparamos nuestros datos con los obtenidos en otros países (Tabla 6. Introducción) vemos que aún son elevados y muy similares a los obtenidos en Turquía y Tailandia (para *C. jejuni*) e Italia (para el ácido nalidíxico, no así para el ciprofloxacino en el que es más bajo). Además, nuestros datos actuales nos alejan un poco de países como China y Corea del Sur, con cifras cercanas al 100% de resistencia, siendo estos dos países lugares donde los antibióticos están permitidos como promotores de crecimiento.

Generalmente, para las bacterias, mantener una resistencia supone un coste biológico, tanto por el mantenimiento de elementos extracromosómicos, como por la existencia de mutaciones cromosómicas. En el caso de la resistencia a quinolonas los porcentajes se mantienen o descienden muy lentamente. Como algunos trabajos han señalado ^{155,233}, las poblaciones resistentes a quinolonas son capaces de colonizar de forma más eficiente que las

sensibles el intestino de las aves, de ahí ese mantenimiento de poblaciones resistentes sin presión antibiótica.

El segundo antibiótico para el que encontramos mayor porcentaje de resistencia es la tetraciclina, con un 48.2% de las cepas del estudio, cifra muy semejante a la obtenida en EEUU en mataderos (48.6%)⁴³⁸. Esta cifra, sin tener en cuenta la especie o etapa de producción es sensiblemente menor que en anteriores estudios en España: 81.2% para *C. jejuni* y 96.7% para *C. coli*^{84,250}. Debemos tener en cuenta que los valores de resistencia frente a tetraciclinas son extremadamente variables entre países e incluso dentro de un mismo país, por ejemplo en EEUU 46%⁴³⁸ frente a 99.5%³⁸¹ en dos estudios diferentes.

El porcentaje de resistencia encontrado frente a amoxicilina fue similar al de otros países europeos¹⁴⁷, como Francia, Suiza, Polonia y Japón (Tabla 8. Introducción) y muy inferior al registrado en nuestro país en anteriores estudios: 55%³⁴³. Por lo general los porcentajes de resistencia en cepas de *Campylobacter* aisladas de pollo son mayores que en otros hospedadores, debido a que el consumo de β -lactámicos en pollo como agente terapéutico es muy superior al de cerdo o ganado vacuno²⁴⁴. Sin embargo, dado que no es un agente para el tratamiento de las campilobacteriosis humanas, su estudio no es considerado de importancia en *Campylobacter*¹⁰⁴. En nuestra opinión, la posibilidad de que β -lactamasas de *Campylobacter* pudieran transmitirse a otros patógenos zoonóticos hace que su estudio sí debiera contemplarse, aunque el conocimiento de las β -lactamasas de *Campylobacter* no está tan desarrollado como para otros grupos de antibióticos.

El porcentaje de resistencia frente a eritromicina, el antibiótico escogido en nuestro estudio dentro del grupo de los macrólidos es, como podemos ver, bajo (3.1%) (Tabla 2. Artículo 4). Este es un dato importante, ya que los macrólidos son los antibióticos de elección frente a las campilobacteriosis severas, por lo que la posibilidad de fallo terapéutico es baja. Nuestros datos están en consonancia con lo observado en la mayoría de países, donde las tasas de resistencia son en general inferiores al 5% (Tabla 7. Introducción). Sin embargo como veremos posteriormente, los datos por especie analizada poseen diferencias significativas.

Al igual que en algún trabajo anterior en España^{283,343}, no se encuentran resistencias frente a fenicoles en las cepas aisladas de aves. Es lógico pensar esto ya que el cloranfenicol está prohibido en animales de abasto en la Unión Europea desde el año 1994¹⁰⁴. La resistencia posee localización plasmídica, por tanto es lógico pensar que sin presión antibiótica, dicho plásmido se pierda en las poblaciones de *Campylobacter*. En cuanto a los aminoglicósidos como la gentamicina, no se encontraron cepas resistentes. Los valores de resistencia frente a este grupo de antibióticos son a nivel mundial bajos, con cifras en general inferiores al 5%

^{84,308,338,399,401}. Esto es debido a que, como algún autor ha descrito, la presencia de integrones en *Campylobacter* es muy baja ⁴¹⁰. Los genes responsables de la resistencia a aminoglicósidos se encuentran alojados en estos elementos móviles. Los datos en España son variables, oscilando del 80% de resistencia para *C. coli* ³⁴³ (1997-1998) hasta un 6.9% para la misma especie en un estudio más reciente (2012) ⁸⁴, pero en general, como en nuestro estudio, son cercanos a una ausencia de resistencia.

En cuanto a las diferencias entre las dos etapas de producción, como podemos observar en la Tabla 2 del artículo 4, los porcentajes de resistencia son siempre superiores en la etapa de PBFs que en GPBFs ($p < 0.001$); además en esta etapa se observa también un mayor porcentaje de cepas multiresistentes. Como ya comentamos anteriormente, es difícil comparar porcentajes de resistencia cuando las granjas tienen características muy diferentes, pero podemos apuntar a dos posibles causas. En primer lugar, en PBFs se aisló un mayor número de cepas identificadas como *C. coli*. Esta especie como varios autores han descrito ^{7,91} ya se ha asociado a una mayor resistencia general frente a diferentes grupos de antimicrobianos así como a un mayor porcentaje de cepas multiresistentes ^{77,339}. Este mayor porcentaje de *C. coli* en la segunda etapa de producción hace que el porcentaje general de cepas resistentes aumente. En segundo lugar, las barreras de bioseguridad son, salvo alguna excepción, menores que en GPBF, lo que posibilita la entrada de cepas del exterior que pueden albergar diferentes mecanismos de resistencia. Tampoco podemos descartar, aunque no nos consta, que en esta etapa de producción se hayan utilizado algunos antimicrobianos como agentes terapéuticos.

En cuanto al análisis por especies, debemos considerar en primer lugar que ambas están distribuidas de desigual forma entre las dos etapas de producción (Tabla 4. Artículo 4). Así, con el criterio escogido de analizar el primer muestreo en cada lote en el que se alcanzaba una prevalencia de al menos un 30%, en la etapa GPBFs solo existen dos lotes analizados en los que detectemos la especie *C. coli* (Lotes M y Q), que como ya hemos comentado (artículos 2 y 3), pertenecen a la misma línea clonal. En segundo lugar debemos considerar que la mayoría de estudios, como ya hemos comentado, indican sin excepción, que la especie *C. coli* es más resistente a antibióticos que *C. jejuni*.

En las granjas de la segunda etapa de producción (PBFs) no encontramos diferencias estadísticamente significativas para las quinolonas entre ambas especies (Tabla 4. Artículo 4), pero sí para el resto de antibióticos. Así, podemos ver como en *C. coli* hay porcentajes muy elevados de resistencia frente a tetraciclina (94.6%) y notables frente a eritromicina (33.8%). Hay que destacar que la resistencia a eritromicina solo se encontró en una población de *C. coli* aislada en una granja de esta etapa (Lote P-H).

Como ya se ha comentado, para la especie *C. coli* parecen existir diferentes grupos clonales asociados a hospedadores animales concretos, siendo diferentes los grupos clonales de origen porcino que los de origen aviar. Estas diferencias se observan también a nivel de resistencia frente a macrólidos, ya que las cepas de origen porcino tienen mayores porcentajes de resistencia ^{27,229} (48-78% origen porcino vs. 11-31%, origen aviar, en un estudio realizado en Francia ²⁵⁸). Una causa puede ser el mayor uso de macrólidos de forma terapéutica en la producción porcina. Nuestros datos para *C. coli* (23.1%) se encuentran dentro de los hallados en otros estudios para cepas de origen aviar (24.1% en España para el periodo 2003-2005) ⁸⁴. Aún teniendo en cuenta que los grupos clonales aviares fuesen menos resistentes a macrólidos que los grupos porcinos, las diferencias entre *C. coli* y *C. jejuni* para este antibiótico son evidentes. En ausencia de una presión antibiótica, el coste de mantener la mutación que permite la resistencia macrólidos sería igual para ambas especies, sin embargo, en *C. coli* se mantiene en mayor porcentaje dicha resistencia sin que se conozca el motivo.

Se considera que, a nivel mundial, las tetraciclinas son los antibióticos más usados de forma terapéutica en producción avícola ³⁰⁴. En nuestro estudio podemos ver las marcadas diferencias entre las dos especies aisladas (Tablas 3 y 4. Artículo 4). La resistencia a tetraciclina en *C. coli* es muy elevada (96.3% de forma conjunta para las dos especies), repitiéndose el patrón observado a nivel mundial (Tabla 9. Introducción). Es además un valor muy semejante al obtenido para esta misma especie en otro estudio llevado a cabo en nuestro país en el periodo 2003-2005 ⁸⁴. Parece evidente que las cepas de *C. coli* aisladas en pollo son más resistentes a tetraciclina que las de *C. jejuni*. Para la especie *C. jejuni*, aún con menores porcentajes de resistencia, los porcentajes pueden ser considerados como moderadamente elevados (40.7%), pero semejantes a los de otros países, como por ejemplo: EEUU, Canadá, Holanda o Bélgica, entre otros (Tabla 9. Introducción).

De forma global un 10.3 % de las cepas del estudio (todas *C. jejuni*) se consideraron pansusceptibles, pese a que en muchos casos compartían el mismo lote de aves que poblaciones resistentes. En ningún caso, como los genotipos 3, 4, 5 y 6 (Artículo 1) eran capaces de persistir entre muestreos, comportamiento diferente al de los genotipos resistentes a ciprofloxacino (genotipos 2 y 15). Esto muestra, quizás, de una forma indirecta cómo la resistencia a quinolonas proporciona un mejor potencial de colonización.

Finalmente, es también destacable la diferencia entre especies en cuanto a poblaciones multiresistentes (11.5 % de las cepas *C. jejuni* frente a 33.3% de las *C. coli*). Esto ha sido observado anteriormente para cepas de *C. coli* aisladas tanto en *broilers* ⁹¹ como en pavo ⁷⁷. Las razones del porqué de esta mayor multiresistencia, así como de un porcentaje de resistencia en general para la especie *C. coli* permanece todavía sin dilucidar.

Una vez establecidos los porcentajes de resistencia para los grupos de antimicrobianos seleccionados nos planteamos conocer los mecanismos moleculares implicados en las resistencias de las cepas del estudio. Como ya hemos visto, se encontró resistencia frente a quinolonas, macrólidos, β -lactámicos y tetraciclina. De estos grupos hemos descartado investigar la resistencia a β -lactámicos por varios motivos: i) se conoce de la existencia de resistencia intrínseca a algunos grupos de β -lactámicos ^{144,315}, ii) solo una β -lactamasa en *Campylobacter* (*bla*_{OXA61}) ha sido bien caracterizada ⁶, existiendo una segunda no bien caracterizada ¹⁴² iii) estudios preliminares en nuestras cepas no publicados muestran que puede haber presencia del gen que codifica para la *bla*_{OXA61} sin existir resistencia a amoxicilina, iv) posible actividad β -lactamasa de enzimas que no tienen esa función de forma original y finalmente, v) la mayoría de organismos internacionales (EFSA, EUCAST,..) consideran que su estudio no es de importancia en cuanto a terapéutica para el hombre, ya que no se usa en el tratamiento de las campilobacteriosis.

Principalmente los macrólidos, seguido de las quinolonas y alguna tetraciclina son, en ese orden, los antibióticos de elección en el tratamiento de campilobacteriosis ²⁵⁸, por lo que el estudio de los determinantes de resistencia a esos grupos de antibióticos en nuestras cepas nos parece de importancia en Salud Pública.

Uno de nuestros objetivos fue observar si existía alguna relación entre el mecanismo de resistencia encontrado y el valor de CMI de la cepa. Aunque el método usado, DDM, es válido para discriminar entre cepas sensibles y resistentes, no proporciona un valor directo de CMI. Por tanto evaluamos los valores de CMI mediante la técnica de E-test® para una selección de cepas. La selección se realizó escogiendo dentro de cada lote de aves una cepa por cada resistotipo diferente. Cuando dentro del mismo resistotipo había dos especies, se escogía una cepa de cada especie.

En cuanto a la resistencia frente a quinolonas, se observó que las CMIs frente a ácido nalidíxico y ciprofloxacino eran muy similares entre las cepas resistentes, independientemente del resistotipo, especie o etapa de producción; por tanto se escogió una cepa por lote dentro del resistotipo más frecuente. En todos los casos, en las cepas resistentes a quinolonas se detectó la mutación Thr86Ile, dentro de la denominada región QRDR. Esto refuerza diversos estudios previos donde esta mutación es la más prevalente en aislados de origen clínico o veterinario dotando de una alta CMI frente a quinolonas ^{7,128,201,417}. En uno de los aislados se encontró otra mutación ya descrita previamente, Pro104Ser, acompañando a Thr86Ile. En este caso no pudimos observar cómo afecta esta mutación a la CMI, ya que en la cepa portadora los valores de CMI para las dos quinolonas eran los máximos detectados con la técnica (32 y 256 mg/L para ciprofloxacino y ácido nalidíxico,

respectivamente). Por tanto, en nuestro estudio se pone de manifiesto que la mutación Thr86Ile no solo no causaría un coste biológico para *Campylobacter*¹⁵⁵, sino que haría que las poblaciones que portan la mutación fueran exitosas colonizando las aves²³³.

Como vimos en el artículo 5, la resistencia frente a macrólidos solo se había detectado en una población de *C. coli* aislada en un lote de aves de la granja P8 (PBFs) y con valores de CMI >256 mg/L. Conocíamos que todas las cepas aisladas en este lote constituían una única población de *C. coli*, ya que habían sido caracterizadas mediante RFLP-PCR del gen *flaA*, *KpnI*-PFGE y *SmaI*-PFGE, por tanto era lógico pensar que la resistencia a macrólidos en todas ellas se debiera al mismo mecanismo. Aún así, y dado que la granja P8 se componía de 3 naves diferentes, escogimos una cepa por nave para ver si esta separación espacial causaba alguna diferencia a nivel de resistencia. Los mecanismos investigados fueron los que se han demostrado como causantes de resistencia de forma más habitual, es decir, mutaciones en el gen del ARNr 23S (*rrn*)^{63,129,215,229} y en los genes ribosómicos *rpID* y *rpIV*^{41,42}.

En las tres cepas investigadas se encontró la mutación más prevalente que causa resistencia a macrólidos en *Campylobacter*: A2075G^{131,215}. Dado que el gen *rrn* posee tres copias en *Campylobacter*, y que el valor de CMI variaría según el número de copias mutadas^{129,291}, nos propusimos investigar este aspecto. Encontramos que las tres copias poseían la mutación A2075G por análisis del electroferograma obtenido en la secuenciación. Finalmente, ninguna de las tres cepas poseía mutaciones descritas en los genes *rpID* y *rpIV*.

En cuanto a la investigación de la resistencia a tetraciclina, a diferencia de las quinolonas, pudimos observar variaciones en los valores de CMI (entre 16 y ≥ 256 mg/L) con independencia de la especie, resistotipo o etapa de producción. Por esa razón escogimos una cepa para cada uno de los resistotipos diferentes que hubiese en cada uno de los lotes de aves.

En *Campylobacter*, el mecanismo molecular implicado en la resistencia a tetraciclina es la expresión del gen *tetO*³¹¹, cuya proteína ejerce una función protectora del sitio ribosómico del ARNr 16S. Todas las cepas resistentes a tetraciclina en el estudio poseían el gen *tetO*, hecho evidenciado mediante PCR. Ahora bien, como podemos ver en la tabla 2 del artículo 5, la localización del gen, investigada mediante *Southern blot* fue tanto cromosómica como plasmídica. Diferentes trabajos no han encontrado relación entre el valor de CMI y la localización del gen *tetO* o entre los polimorfismos a lo largo del gen y el valor de CMI^{304,311}. En nuestro estudio encontramos, de forma adicional, una aparente falta de relación entre el valor de CMI con la especie portadora del gen.

Pese a que hay variedad de tamaños en los plásmidos encontrados, la mayoría de los portadores de *tetO* son de alrededor de 60 Kb, lo cual entra dentro del rango descrito por

otros autores (30-58 Kb) ^{7,311}. Esto nos indica que, como se ha sugerido, los plásmidos de resistencia a tetraciclina tienen una naturaleza conservada, con gran homología en cuanto a tamaño y secuencia ^{24,121}. Esto puede proporcionar a las cepas portadoras de dichos plásmidos una ventaja evolutiva, permitiendo el intercambio de diferentes genes usando el plásmido de resistencia a tetraciclina como vehículo ¹²¹.

Los plásmidos de resistencia a tetraciclina pueden integrarse en el cromosoma, transferirse a otras células mediante conjugación, o ser de naturaleza no movilizable (no conjugativos) ^{17,213,311}. Conocer este aspecto es muy importante en epidemiología de las resistencias, porque podemos saber si hay riesgo de transmisión de esa resistencia a otras poblaciones de cepas sensibles dentro de una misma granja. Con el objetivo de conocer la naturaleza transmisible o no de los plásmidos portadores de resistencia a tetraciclina en las cepas de origen aviar investigadas, escogimos cuatro cepas de *C. jejuni* portadoras de plásmidos, con diferentes valores de CMI (32, 96 y 256 mg/L) y como receptoras dos cepas de *C. jejuni* sensibles a tetraciclina, sin ningún plásmido detectable. Como característica diferencial de las cepas receptoras hay que destacar que eran portadoras de la mutación A2075G en el gen *rrn*, por tanto, resistentes a macrólidos. Nos aseguramos una selección de transconjugantes por un marcador cromosómico, teóricamente no transmisible. Otros estudios utilizan como marcador de selección la resistencia a quinolonas ³⁵⁷, pero en nuestra opinión, la adquisición de resistencia a quinolonas se produce de forma tan sencilla y rápida en *Campylobacter* que al usar medios selectivos que contuvieran alguna quinolona favoreceríamos la aparición de resistentes a quinolonas y por tanto falsos transconjugantes. Las cuatro cepas portadoras de plásmidos de resistencia a tetraciclina escogidas fueron capaces de movilizar el plásmido a una o las dos cepas receptoras, aunque los valores de CMI finales eran varias diluciones inferiores. Esto nos revela que la posibilidad de transmisión de la resistencia a tetraciclina es un hecho muy probable dentro de los lotes de aves.

Por otra parte, quisimos investigar si dentro de un mismo genotipo de *Campylobacter* resistente a tetraciclinas era posible localizar el gen *tetO* simultáneamente en cromosoma y en plásmido. Es decir, tener alguna prueba de integración de parte o todo el plásmido de resistencia en el cromosoma bacteriano. Para ello, hemos comparado los pulsotipos de las cepas de aquellos lotes en los que encontrábamos las dos localizaciones de *tetO*. Como podemos ver en la figura 1 (Artículo 5), la máxima semejanza entre genotipos con distintas localizaciones dentro de un mismo lote es de un 62%, valor insuficiente para afirmar que pertenecen al mismo genotipo o población. En definitiva, no encontramos poblaciones de cepas que posean de forma simultánea *tetO* en cromosoma y plásmido.

Una vez conocidos los porcentajes de resistencia a antimicrobianos y los mecanismos que lo causan, quisimos investigar qué sucedía en las cepas de *Campylobacter* de origen clínico (obtenidas de pacientes de diferentes hospitales) recibidas por el Servicio de Enterobacterias, centrándonos en la familia de antibióticos de mayor importancia terapéutica, los macrólidos.

Por una parte, compararíamos los porcentajes de resistencia obtenidos en cepas de origen humano (*C. jejuni* y *C. coli*) durante los años 2006-2007 con los valores obtenidos en cepas del mismo origen en otros estudios tanto en nuestro país como en otros países de nuestro entorno. También se compararían los valores obtenidos con los que hemos obtenido en aves de consumo. Finalmente, investigaríamos los mecanismos de resistencia en las cepas de origen humano, para comprobar si son los mismos que en las aisladas en aves.

Como se puede observar (Tabla 1. Artículo 6), la distribución de valores de CMI es bimodal, con un gran grupo con CMIs entre 0.5-8 mg/L y otro, de menor tamaño, de resistentes, con valores ≥ 256 mg/L. A diferencia de lo que señalan algunos autores ²⁹¹, no se observan apenas cepas con resistencia intermedia o baja (8-64 mg/L). Se estima que estos valores se alcanzan principalmente con mutaciones de laboratorio. El valor promedio de resistencia entre las cepas de origen clínico durante el periodo 2006-2007 en nuestro estudio fue de un 3.7%, valor similar a los obtenidos en nuestro país en distintos periodos para cepas del mismo origen: 3.2% periodo 1987-93 ³¹⁸ o 2.3% en el periodo 1988-92 ³⁵⁴. Esto nos indica, como algunos autores han señalado, que las resistencias frente a macrólidos se mantienen en general bajas a lo largo del tiempo ²⁷. También es destacable que son valores similares a los de otros países europeos como Francia (3.5%) o Finlandia (1-3%) ¹⁰⁷.

Los valores obtenidos en cepas de origen clínico son ligeramente superiores a los obtenidos en cepas aisladas de pollo (3.7% vs. 2.3%), aunque en ambos casos son bajos. Al igual que en nuestro análisis de las cepas obtenidas en pollo, las diferencias principales se obtienen entre especies. Así, solamente dos cepas de *C. jejuni* de origen humano fueron consideradas resistentes a macrólidos (0.3%), lo que incide, como varios estudios han señalado, en la escasa prevalencia de la resistencia frente a macrólidos en esta especie (Tabla 7). Los datos para *C. coli* fueron prácticamente iguales en cepas de origen humano como de pollo (23.5% vs. 23.1%, respectivamente), lo cual puede ser otra prueba indirecta del origen aviar de las cepas de *C. coli* patógenas para el hombre.

En cuanto a los mecanismos de resistencia frente a macrólidos en las cepas de origen clínico, al igual que en las de origen aviar, las mutaciones en la región V del gen *rrn* son las principales causantes de resistencias con alto valor de CMI frente a los macrólidos ^{63,129,131}. Varias mutaciones han sido descritas (A2075G, A2074G, A2074C), siendo la primera de

ellas la más prevalente. Esto se debería a que la mutación A2075G parece ser más estable en las cepas portadoras ¹²⁹ (esta mutación no se perdería rápidamente en subcultivos de la cepa) y haría que la cepa conservase la capacidad de colonización ⁴². Esta observación de una mayor prevalencia de la mutación se cumple en nuestro estudio, donde solo dos cepas (una de la especie *C. jejuni* y otra *C. coli*) poseen la mutación A2074G, poseyendo el resto la mutación A2075G.

Se observó que, de forma general, la región secuenciada del gen *rrn* era muy conservada, con pocos polimorfismos (Tabla 2. Artículo 6), Además, la mayoría de los descritos se encontraban en un pequeño grupo de tres cepas de *C. coli* que procedían del mismo hospital y que habían sido aisladas en dos periodos de tiempo diferentes. Desconocemos el origen de esas tres cepas y la razón de acumular un mayor número de polimorfismos, aunque quizás podemos estar ante una representación de un pequeño grupo clonal de *C. coli*.

En la secuenciación de los genes *rpID* y *rpIV* se describieron numerosas mutaciones y polimorfismos, aunque ninguno de estos coincidía con los descritos previamente como causantes de resistencia a macrólidos (mutaciones puntuales en *rpID* e inserción en *rpIV*) ^{41,42}. Para descartar la influencia en la resistencia a macrólidos, se secuenciaron esos dos genes en un número importante de cepas sensibles a macrólidos (128 *C. jejuni* y 37 *C. coli*, dentro de las cepas de origen clínico recibidas en los años 2006 y 2007), revelando que los polimorfismos descritos en este trabajo se encontraban tanto en resistentes como en sensibles. Los polimorfismos se encuentran en zonas (especialmente las inserciones en *rpIV*) que no afectan a la interacción del macrólido con el ribosoma bacteriano. Sí pudimos observar como las cepas de *C. coli* poseen menor número de polimorfismos, lo que refuerza de algún modo la idea de que en esta especie existe una mayor clonalidad.

Dado que algunos autores han señalado que la sobreexpresión de la bomba de eflujo CmeABC actúa de forma sinérgica con las mutaciones en *rrn*, *rpID* y *rpIV* para conferir CMIs muy elevadas frente a macrólidos ^{40,41,129}, nos propusimos secuenciar la zona de regulación del operón que controla la expresión de esta bomba. Debemos señalar que esta bomba no es específica para macrólidos, actuando en *Campylobacter* expulsando diferentes antibióticos, detergentes y colorantes, aunque su función fisiológica principal es la resistencia a sales biliares durante la colonización intestinal ²²².

La regulación de la expresión de *cmeABC* se realiza por medio de un represor, CmeR, que se une a una zona del promotor de *cmeABC*, donde se forma una horquilla de ADN por medio de una secuencia inversa repetida: **TGTAATAAAAATTACA**. Se conocen tres mutaciones

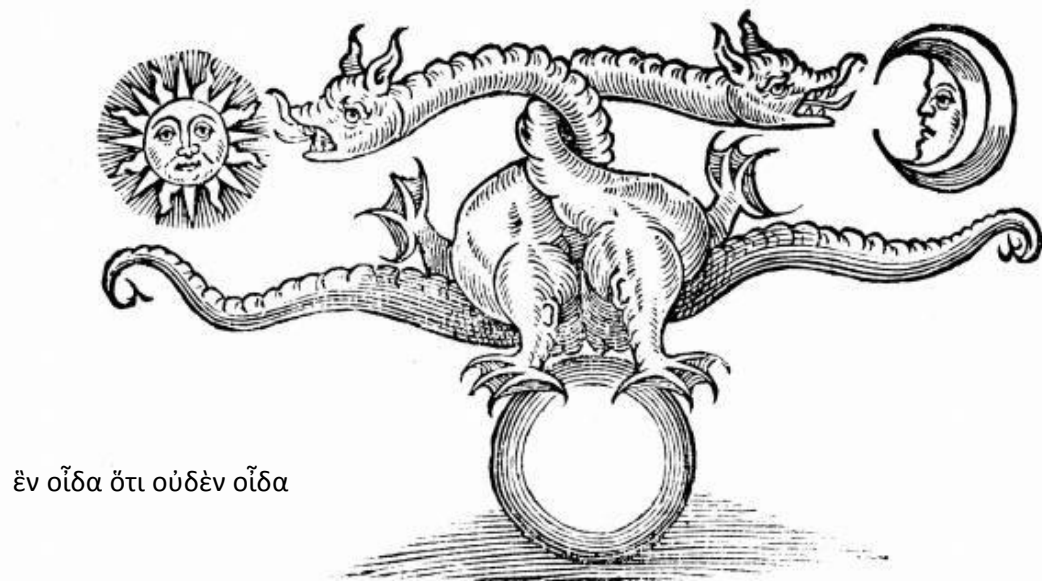
en esta región: dos deleciones entre las dos zonas repetidas de la horquilla ^{158,221} y una transición C— T en la secuencia repetida ⁴⁰.

En la secuenciación de las cepas de origen clínico nos encontramos con un primer polimorfismo en cuanto al tamaño de la región de regulación. De forma tradicional la región se describía como de 94 pares de bases, mientras que nosotros hemos encontrado un grupo de cepas en las que el tamaño era de 107 pares de bases, aunque esta diferencia no parece afectar a la función de la zona de regulación mientras que la secuencia inversa repetida se mantenga en secuencia y tamaño. Como se observa en la figura 1 del artículo 6, describimos diferentes mutaciones que teóricamente afectarían la regulación de la expresión, impidiendo la correcta unión de CmeR y por tanto sobreexpresando el operón *cmeABC*. Es destacable que es la primera vez que se describe *in vivo* la mutación C-36 T, ya que la descripción original se llevó a cabo en cepas mutantes obtenidas en laboratorio ⁴⁰. Sin embargo, por el momento, desconocemos si todas esas mutaciones descritas producen sobreexpresión o no de *cmeABC* y si esto contribuye no solo a una mayor tolerancia a los macrólidos u otras familias de antibióticos.

CONCLUSIONES

Reasoning draws a conclusion, but does not make the conclusion certain, unless the mind discovers it by the path of experience.

Roger Bacon



ἐν οἶδα ὅτι οὐδὲν οἶδα

Conclusiones

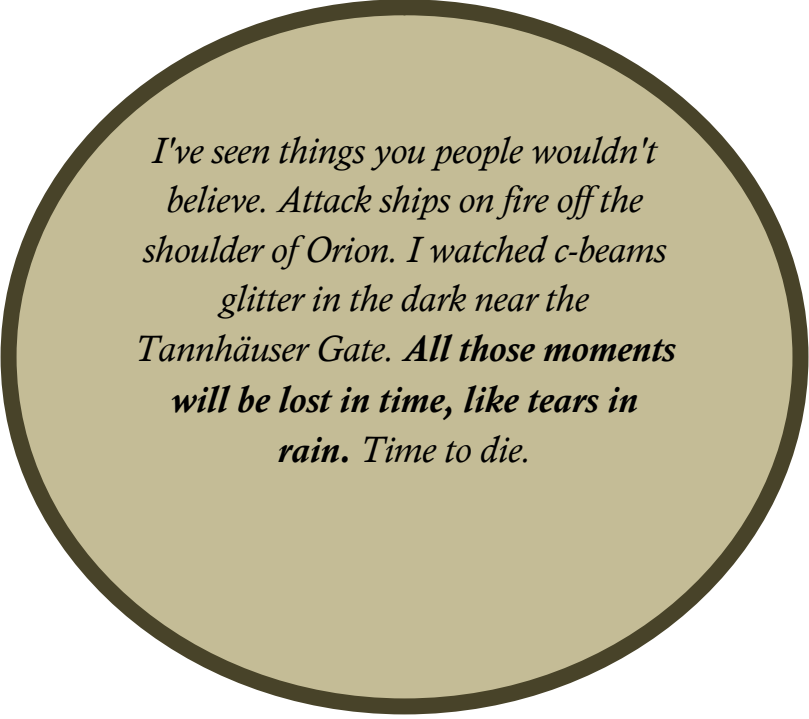
1. La prevalencia de *Campylobacter* spp., en cuanto a número de aves colonizadas/lote, es dependiente de la edad de las aves durante la etapa de GPBF. De forma general, hasta la semana 20 de vida no se produce colonización. Al final de la vida productiva, los lotes de aves están colonizados en cifras cercanas al 100%. Esto no ocurre en la siguiente etapa de producción (PBF) donde la colonización es independiente de la edad. Las diferencias en las prevalencias de *Campylobacter* y en la influencia de la edad entre ambas etapas de producción refleja las diferencias en cuanto a medidas de bioseguridad y manejo de las aves.
2. Se consiguió establecer un valor de corte (valor cut-off) para decidir si dos cepas de *Campylobacter* pertenecen al mismo genotipo cuando se comparan con dos enzimas de restricción en la técnica de PFGE.
3. Se ha observado que las poblaciones de *Campylobacter* en las granjas avícolas son extremadamente dinámicas, con alternancia, sustituciones y desaparición de poblaciones.
4. Mediante la comparación de marcadores moleculares se identificó en un caso al agua de bebida como fuente de colonización de *Campylobacter coli* en dos granjas de recría (GPBF).
5. En otra ocasión se determinó que el exterior de las granjas fue una fuente o reservorio de cepas de *Campylobacter jejuni* para la colonización de las aves en GPBF. La dirección de colonización (granja-exterior o exterior-granja) pudo teorizarse gracias al uso del fenotipo de resistencia.
6. Se han descrito cepas de *C. jejuni* posiblemente con un hábitat exclusivamente ambiental, siendo cepas no colonizadoras. Existe por tanto variedad de hábitats y hospedadores posibles de esta especie.
7. El marcador molecular RFLP-PCR del gen *flaA* se ha mostrado de mucha utilidad para iniciar estudios epidemiológicos en *Campylobacter*, aunque requiere el apoyo de otras herramientas como PFGE o MLST para obtener conclusiones correctas.

8. Mediante comparación de marcadores moleculares se ha demostrado la existencia de una línea o grupo clonal de *C. coli* aislado en las aves del estudio y causante de gastroenteritis en España en un periodo amplio de tiempo (2002-2007).
9. Se ha puesto de manifiesto el alto porcentaje de resistencia frente a quinolonas en las cepas de *C. jejuni* y *C. coli* aisladas en pollo. Sin embargo, se observó una reducción importante frente a otros estudios de nuestro país llevados a cabo en años anteriores.
10. Los porcentajes de resistencia frente a otros antimicrobianos como la tetraciclina, eritromicina y amoxicilina fueron comparables a los de otros países europeos. No se encontró resistencia frente a algunos antimicrobianos: gentamicina, cloranfenicol y amoxicilina más ácido clavulánico.
11. Se destaca el bajo porcentaje de resistencia a macrólidos, antibióticos de elección frente a campilobacteriosis severas, entre las cepas aisladas en las dos etapas de producción de *broilers*. Esta resistencia se halló en una sola población de *C. coli*.
12. Las cepas aisladas de aves pertenecientes a la especie *Campylobacter coli* se muestran más resistentes a la mayoría de antimicrobianos que *Campylobacter jejuni*, así como más portadoras de multiresistencias.
13. Se encontraron diferencias en los porcentajes de resistencia con respecto a la etapa de producción (GPBF o PBF). En PBFs se encontró un mayor número de cepas resistentes a todos los antimicrobianos, un mayor número de multiresistentes y menor de pansusceptibles.
14. La resistencia a quinolonas se debió en todos los casos a una mutación puntual en *gyrA*, Thr86Ile, que ya se ha descrito como la más prevalente en cepas de origen clínico y veterinario.
15. La resistencia a macrólidos en la única población encontrada en las cepas de origen aviar se debió al mecanismo descrito con mayor prevalencia, la mutación A2075G en el ADNr 23S (gen *rrn*).
16. La resistencia frente a tetraciclina en las cepas aisladas de las aves del estudio se debió a la expresión del gen *tetO*. Se localizó este gen en cromosoma y en plásmido. No se encontró relación entre la localización del gen *tetO* o la especie portadora del mismo con las variaciones en los valores de

CMI para las cepas resistentes a tetraciclina encontradas. Mediante experimentos de conjugación, se demostró la naturaleza transmisible de la resistencia a tetraciclina en una selección de cepas.

17. Se estudió la resistencia a macrólidos en cepas de *C. jejuni* y *C. coli* de origen clínico. Los porcentajes de resistencia encontrados fueron bajos y comparables a los de otros países europeos. Al igual que en las cepas de origen aviar, la especie mayoritaria donde se encontró esta resistencia fue *C. coli*.
18. Se estudiaron los mecanismos de resistencia frente a macrólidos en las cepas de origen clínico. El mecanismo causante de la resistencia a macrólidos en estas cepas fue la mutación A2075G en el gen *rrm*. De forma minoritaria, se encontró también la mutación A2074G en el mismo gen únicamente en dos cepas.

POSIBLES TRABAJOS FUTUROS DERIVADOS DE ESTA TESIS



*I've seen things you people wouldn't
believe. Attack ships on fire off the
shoulder of Orion. I watched c-beams
glitter in the dark near the
Tannhäuser Gate. **All those moments
will be lost in time, like tears in
rain. Time to die.***

Estudio de las poblaciones de *Campylobacter* spp. a través del gen ribosómico *rpIV* y su proteína, L22

Durante el estudio de la resistencia a macrólidos en cepas de origen clínico, se secuenció un número importante de cepas de *C. jejuni* y *C. coli* tanto resistentes como sensibles a este grupo de antimicrobianos para conocer la influencia de los polimorfismos encontrados en el gen *rpIV* con el valor de CMI registrado para macrólidos (eritromicina). Observamos que la comparación de las secuencias del gen ribosómico *rpIV* nos permitía identificar correctamente a las cepas dentro de la especie a la que pertenecía (*C. jejuni* o *C. coli*), corrigiendo incluso alguna mala identificación realizada mediante el test de hidrólisis del hipurato.

Los *primers* publicados (Artículo 5 y Artículo 6) para amplificar el gen *rpIV* servían de igual modo para otras especies, como *C. lari* o *C. fetus*. Para comprobar su poder de diferenciación entre especies se secuenciaron 11 cepas adicionales de la especie *C. fetus* y 5 cepas de la especie *C. lari*. La comparación de las secuencias del gen *rpIV* mediante un modelo evolucionario (*Maximum parsimony tree*) nos da una idea, por una parte, de la correcta separación entre especies, y por otra, de la mayor cercanía evolutiva de *C. jejuni* y *C. coli*.

Como posible trabajo futuro se plantea la idea de diseñar un PCR basada en este gen para diferenciar entre estas especies.

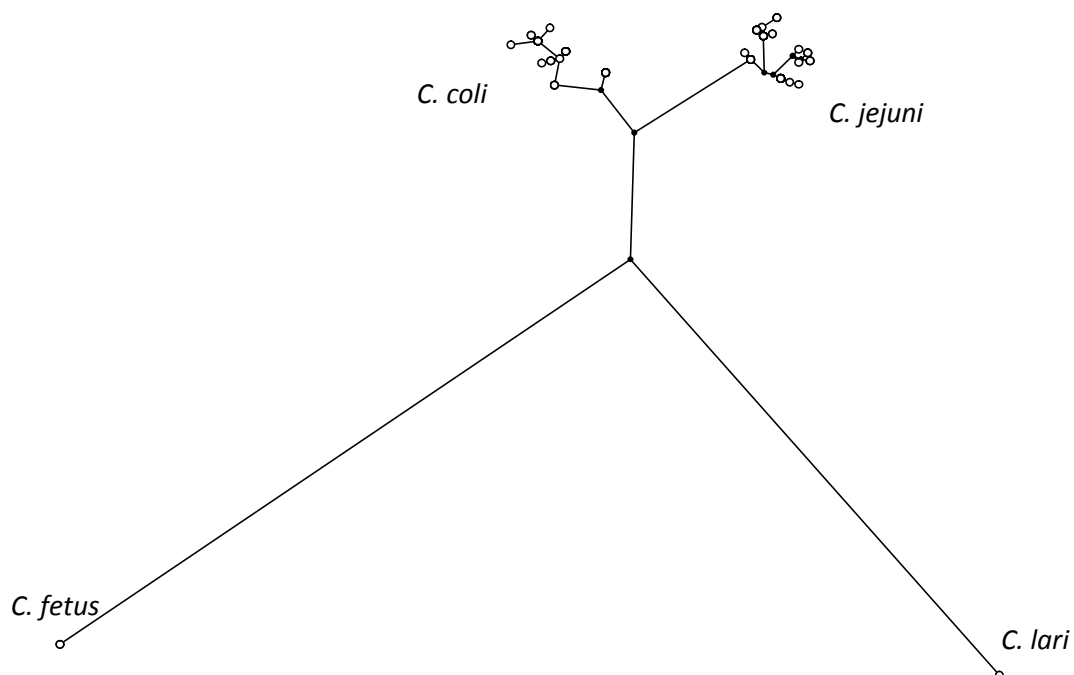


Figura 10: Comparación de la secuencia del gen *rpIV* en varias especies de *Campylobacter* spp. mediante un modelo evolutivo (*Maximun parsimony tree*).

Por otra parte, todas las secuencias del gen *rpIV* además de clasificar correctamente entre especies, se clasifican en diferentes grupos: 25 para *C. jejuni* y 10 para *C. coli*. Esto nos hizo plantearnos si la clasificación en grupos que hace la secuencia del gen *rpIV* pudiera ser equiparable a la que realizan otros marcadores moleculares como el SVR-*flaA* o el MLST y por tanto la secuencia de ese gen ser utilizada como herramienta de tipificación molecular.

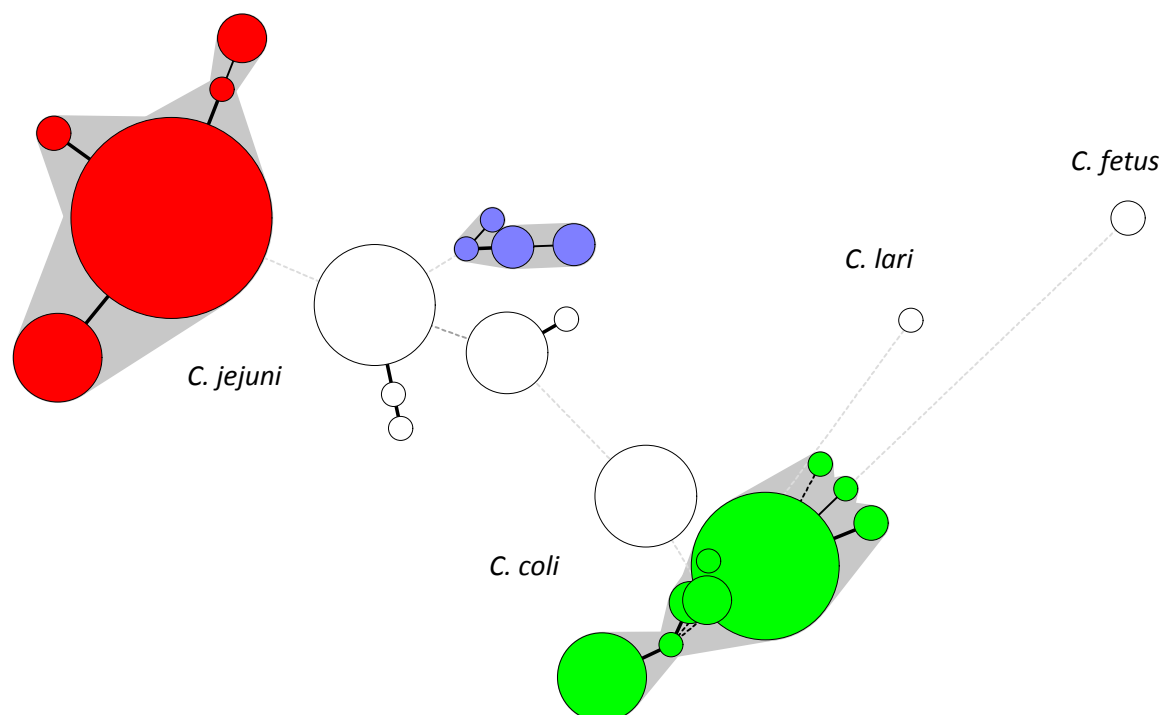


Figura 11. Distribución de parte de las secuencias del gen *rpIV* analizadas usando un modelo poblacional: *Minimum spanning tree*.

Hemos iniciado la comparación de cepas ya tipificadas por MLST, sin relación epidemiológica conocida entre ellas (casos clínicos) así como con una relación entre ellas (pertenecientes a brotes alimentarios, o constitutivas del mismo *cluster* de cepas de origen aviar, Anexo II). Los resultados preliminares son prometedores, aunque se necesitan más comparaciones para validar el método.

Estudio de las mutaciones en la zona de regulación del operón *cmeABC* y su influencia en la resistencia a diferentes antimicrobianos

La regulación del operón *cmeABC* en *Campylobacter* spp. se ejerce por medio de un represor (CmeR) que se une a la zona de regulación del operón (zona inversa repetida), lo que impide, de forma natural, una expresión constante de la bomba de eflujo CmeABC. Cuando en el medio existen determinadas moléculas como las sales biliares, la unión de CmeR no se produce y la bomba de eflujo se expresa.

Mutaciones en esta zona de regulación hacen que se sobreexpresa el operón *cmeABC* con respecto a las cepas *wild type* o no mutantes. Se conocen varias mutaciones en esta zona, pero por lo que sabemos, solo dos de ellas han sido investigadas para conocer si efectivamente producen sobreexpresión de *cmeABC* y si tienen relación con una mayor resistencia a antibióticos en las cepas de *Campylobacter* que las portan.

En el estudio de las cepas de origen clínico resistentes a macrólidos se encontraron seis mutaciones diferentes afectando a la zona de regulación del operón *cmeABC*. Una de ellas (C-36T) había sido descrita previamente *in vitro*. Encontramos esa misma mutación (C-36T) en una población multiresistente de *C. jejuni* de origen aviar (Lote M). Dicha población compartía el mismo lote de aves (mismo nicho ecológico) que una población de *C. jejuni* que era resistente solo a quinolonas. Nos planteamos si esta mutación que de forma *in vitro* produce sobreexpresión de *cmeABC* se comportaba igual en cepas aisladas de aves y si pudiera conducir a una multiresistencia en la población que porta la mutación.

Se ha investigado la expresión de *cmeABC* en ambas poblaciones de origen aviar mediante RT-qPCR encontrando diferencias de expresión para este operón (2.5 veces más en las portadoras de la mutación C-36T, lo que está dentro de lo observado para las mutaciones en la zona de regulación en experimentos *in vitro*).

Nuestro objetivo sería la investigación de la expresión de *cmeABC* en las cepas de origen clínico en las que se han identificado todas las mutaciones descritas en la zona de regulación (Artículo 6), así como un *screening* de mutaciones en la zona de regulación del operón en cepas multiresistentes de origen aviar y clínico.

Estudio de cepas atípicas con fenotipo NaI^SCip^R

En el estudio de los porcentajes de resistencia en cepas de origen aviar, como ya se comentó en el artículo 4, se han reflejado los resultados obtenidos en las cepas aisladas en el primer muestreo de cada lote en el que se alcanzaba un 30% de prevalencia de aves colonizadas por *Campylobacter*. Durante la realización del antibiograma a cepas de otros muestreos se encontró una de ellas (Lote P) de la especie *C. jejuni* que poseía un perfil atípico en cuanto a la resistencia a quinolonas: NaI^SCip^R. De forma adicional, en el año 2007 se recibió una cepa de origen clínico con el mismo perfil atípico de resistencia a quinolonas.

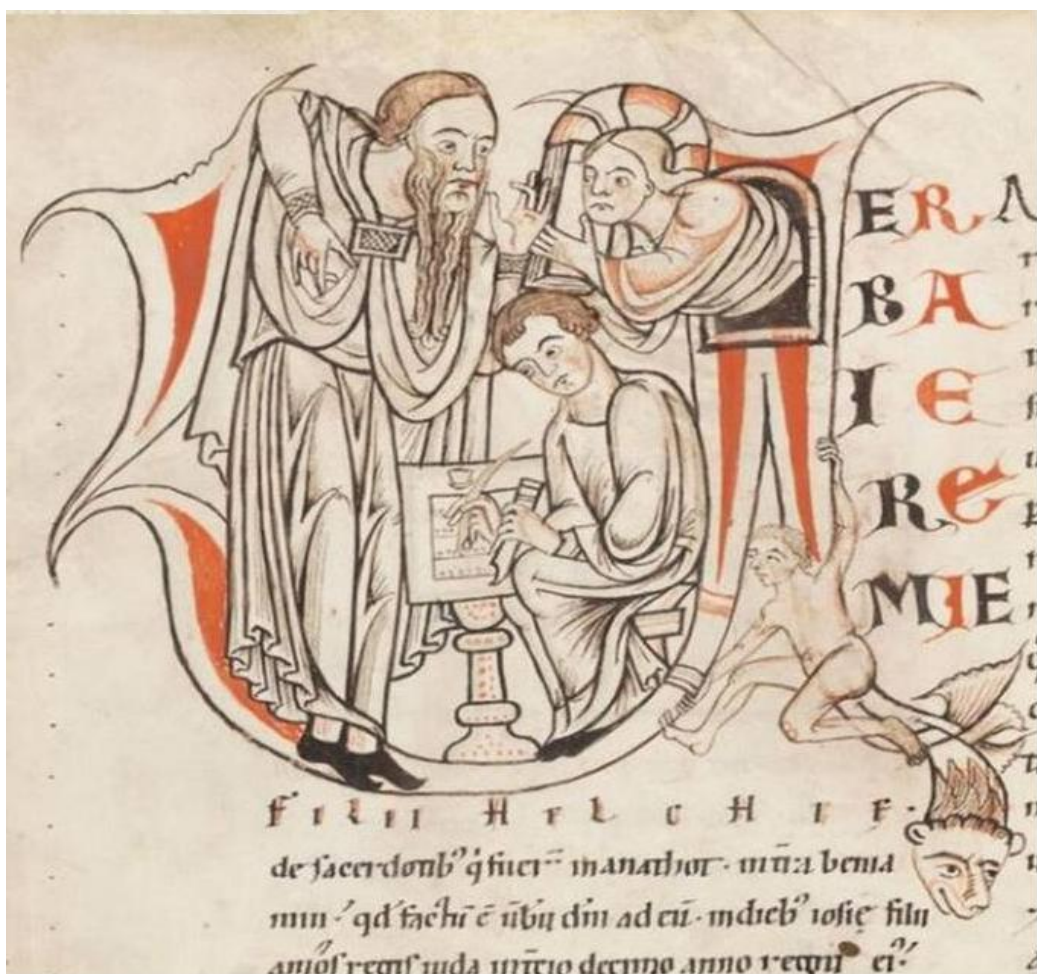
Ambas cepas poseían la mutación Thr86Ile, que como hemos visto conduce a resistencia frente a quinolonas, con altos valores de CMI, tanto para ácido nalidíxico como para ciprofloxacino. Sin embargo, al ser sensible al ácido nalidíxico nos hizo plantearnos si habría otros mecanismos o mutaciones implicados en este perfil atípico. Este perfil ya se había descrito anteriormente, sin que se hubiera explicado el mecanismo causante.

Las dos cepas atípicas no poseen ningún mecanismo tipo Qnr, o enzimas tipo aac(6')-Ib-cr, o al menos no han amplificado ningún gen de este tipo en análisis por PCR. Es más, carecen de plásmidos, que es donde suelen estar asociados estos mecanismos. El análisis de *gyrB* no ha arrojado ninguna característica diferencial con respecto a otras cepas, sensibles o resistentes.

Hemos secuenciado el gen *gyrA* en su totalidad, lo que ha implicado tener que diseñar algunos *primers* fuera de este gen y pertenecientes a dos genes adyacentes distintos. No se ha encontrado ningún polimorfismo exclusivo de estas dos cepas en la región QRDR, sin embargo, sí hemos hallado dos polimorfismos fuera de la zona QRDR y presentes solo en esas dos cepas.

Nuestra intención es ahora, por una parte secuenciar la región donde se han hallado estos dos polimorfismos en un número mayor de cepas, resistentes y sensibles, para verificar si estos dos polimorfismos son exclusivos del perfil NaI^SCip^R. También podría ser interesante transformar cepas resistentes a quinolonas con la mutación Thr86Ile y mediante recombinación sustituir la región donde hemos descrito esos polimorfismos y ver qué fenotipo de resistencia se obtiene.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



1. **Aarestrup F.M., and Engberg J.** 2001. Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. *Vet Res* 32: 311-21.
2. **Abe T., Haga S., Yokoyama K., and Watanabe N.** 2008. An outbreak of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* infection via tap water. *Jpn J Infect Dis* 61: 327.
3. **Acke E., McGill K., Lawlor A., Jones B.R., Fanning S., and Whyte P.** 2010. Genetic diversity among *Campylobacter jejuni* isolates from pets in Ireland. *Vet Rec* 166: 102-6.
4. **Ackermann H.W.** 2007. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch Virol* 152: 227-43.
5. **Adkin A., Hartnett E., Jordan L., Newell D., and Davison H.** 2006. Use of a systematic review to assist the development of *Campylobacter* control strategies in broilers. *J Appl Microbiol* 100: 306-15.
6. **Alfredson D.A., and Korolik V.** 2005. Isolation and expression of a novel molecular class D beta-lactamase, OXA-61, from *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 2515-8.
7. **Alfredson D.A., and Korolik V.** 2007. Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiol Lett* 277: 123-32.
8. **Alter T., Weber R.M., Hamedy A., and Glunder G.** 2011. Carry-over of thermophilic *Campylobacter* spp. between sequential and adjacent poultry flocks. *Vet Microbiol* 147: 90-5.
9. **Allen V.M., Ridley A.M., Harris J.A., Newell D.G., and Powell L.** 2011. Influence of production system on the rate of onset of *Campylobacter* colonization in chicken flocks reared extensively in the United Kingdom. *Br Poult Sci* 52: 30-9.
10. **Allen V.M., Weaver H., Ridley A.M., Harris J.A., Sharma M., Emery J., Sparks N., Lewis M., and Edge S.** 2008. Sources and spread of thermophilic *Campylobacter* spp. during partial depopulation of broiler chicken flocks. *J Food Prot* 71: 264-70.
11. **Allos B.M.** 2001. *Campylobacter jejuni* Infections: update on emerging issues and trends. *Clin Infect Dis* 32: 1201-6.
12. **Andersson D.I., and Hughes D.** 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol* 8: 260-71.
13. **Appelbaum P.C., and Hunter P.A.** 2000. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *Int J Antimicrob Agents* 16: 5-15.
14. **Aquino M.H., Filgueiras A.L., Ferreira M.C., Oliveira S.S., Bastos M.C., and Tibana A.** 2002. Antimicrobial resistance and plasmid profiles of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from human and animal sources. *Lett Appl Microbiol* 34: 149-53.
15. **Arsenault J., Michel P., Berke O., Ravel A., and Gosselin P.** 2011. Environmental characteristics associated with campylobacteriosis: accounting for the effect of age and season. *Epidemiol Infect*: 1-12.
16. **Asai T., Harada K., Ishihara K., Kojima A., Sameshima T., Tamura Y., and Takahashi T.** 2007. Association of antimicrobial resistance in *Campylobacter* isolated from food-producing animals with antimicrobial use on farms. *Jpn J Infect Dis* 60: 290-4.
17. **Avrain L., Vernozy-Rozand C., and Kempf I.** 2004. Evidence for natural horizontal transfer of *tetO* gene between *Campylobacter jejuni* strains in chickens. *J Appl Microbiol* 97: 134-40.
18. **Bacon D.J., Alm R.A., Burr D.H., Hu L., Kopecko D.J., Ewing C.P., Trust T.J., and Guerry P.** 2000. Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infect Immun* 68: 4384-90.
19. **Bachoual R., Ouabdesselam S., Mory F., Lascols C., Soussy C.J., and Tankovic J.** 2001. Single or double mutational alterations of *gyrA* associated with fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Microb Drug Resist* 7: 257-61.
20. **Bare J., Sabbe K., Van Wichelen J., van Gremberghe I., D'Hondt S., and Houf K.** 2009. Diversity and habitat specificity of free-living protozoa in commercial poultry houses. *Appl Environ Microbiol* 75: 1417-26.
21. **Barrett T.J., Gerner-Smidt P., and Swaminathan B.** 2006. Interpretation of pulsed-field gel electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance. *Foodborne Pathog Dis* 3: 20-31.
22. **Barton Behravesh C., Jones T.F., Vugia D.J., Long C., Marcus R., Smith K., Thomas S., Zansky S., Fullerton K.E., Henao O.L. and others.** 2011. Deaths associated with bacterial pathogens transmitted commonly through food: foodborne diseases active surveillance network (FoodNet), 1996-2005. *J Infect Dis* 204: 263-7.

23. **Barton C., Ng L.K., Tyler S.D., and Clark C.G.** 2007. Temperate bacteriophages affect pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* 45: 386-91.
24. **Batchelor R.A., Pearson B.M., Friis L.M., Guerry P., and Wells J.M.** 2004. Nucleotide sequences and comparison of two large conjugative plasmids from different *Campylobacter* species. *Microbiology* 150: 3507-17.
25. **Bates C., Hiatt K.L., and Stern N.J.** 2004. Relationship of *Campylobacter* isolated from poultry and from darkling beetles in New Zealand. *Avian Dis* 48: 138-47.
26. **Behringer M., Miller W.G., and Oyarzabal O.A.** 2011. Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from live broilers and retail broiler meat by *flaA*-RFLP, MLST, PFGE and REP-PCR. *J Microbiol Methods* 84: 194-201.
27. **Belanger A.E., and Shryock T.R.** 2007. Macrolide-resistant *Campylobacter*: the meat of the matter. *J Antimicrob Chemother* 60: 715-23.
28. **Bessede E., Delcamp A., Sifre E., Buissonniere A., and Megraud F.** 2011. New methods for detection of campylobacters in stool samples in comparison to culture. *J Clin Microbiol* 49: 941-4.
29. **Bessell P.R., Matthews L., Smith-Palmer A., Rotariu O., Strachan N.J., Forbes K.J., Cowden J.M., Reid S.W., and Innocent G.T.** 2010. Geographic determinants of reported human *Campylobacter* infections in Scotland. *BMC Public Health* 10: 423.
30. **Boonmar S., Morita Y., Fujita M., Sangsuk L., Suthivarakom K., Padungtod P., Maruyama S., Kabeya H., Kato M., Kozawa K. and others.** 2007. Serotypes, antimicrobial susceptibility, and *gyrA* gene mutation of *Campylobacter jejuni* isolates from humans and chickens in Thailand. *Microbiol Immunol* 51: 531-7.
31. **Boosinger T.R., Blevins W.T., Heron J.V., and Sunter J.L.** 1990. Plasmid profiles of six species of *Campylobacter* from human beings, swine, and sheep. *Am J Vet Res* 51: 718-22.
32. **Broman T., Waldenstrom J., Dahlgren D., Carlsson I., Eliasson I., and Olsen B.** 2004. Diversities and similarities in PFGE profiles of *Campylobacter jejuni* isolated from migrating birds and humans. *J Appl Microbiol* 96: 834-43.
33. **Buhr R.J., Cox N.A., Stern N.J., Musgrove M.T., Wilson J.L., and Hiatt K.L.** 2002. Recovery of *Campylobacter* from segments of the reproductive tract of broiler breeder hens. *Avian Dis* 46: 919-24.
34. **Bull S.A., Allen V.M., Domingue G., Jorgensen F., Frost J.A., Ure R., Whyte R., Tinker D., Corry J.E., Gillard-King J. and others.** 2006. Sources of *Campylobacter* spp. colonizing housed broiler flocks during rearing. *Appl Environ Microbiol* 72: 645-52.
35. **Bullman S., Corcoran D., O'Leary J., O'Hare D., Lucey B., and Sleator R.D.** 2011. Emerging dynamics of human campylobacteriosis in Southern Ireland. *FEMS Immunol Med Microbiol* 63: 248-53.
36. **Bullman S., O'Leary J., Corcoran D., Sleator R.D., and Lucey B.** 2011. Molecular-based detection of non-culturable and emerging campylobacteria in patients presenting with gastroenteritis. *Epidemiol Infect*: 1-5.
37. **Butzler J.P.** 2004. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clin Microbiol Infect* 10: 868-76.
38. **Byrd J., Bailey R.H., Wills R., and Nisbet D.** 2007. Recovery of *Campylobacter* from commercial broiler hatchery trayliners. *Poult Sci* 86: 26-9.
39. **Byrne C.M., Clyne M., and Bourke B.** 2007. *Campylobacter jejuni* adhere to and invade chicken intestinal epithelial cells in vitro. *Microbiology* 153: 561-9.
40. **Cagliero C., Maurel M.C., Cloeckaert A., and Payot S.** 2007. Regulation of the expression of the CmeABC efflux pump in *Campylobacter jejuni*: identification of a point mutation abolishing the binding of the CmeR repressor in an in vitro-selected multidrug-resistant mutant. *FEMS Microbiol Lett* 267: 89-94.
41. **Cagliero C., Mouline C., Cloeckaert A., and Payot S.** 2006. Synergy between efflux pump CmeABC and modifications in ribosomal proteins L4 and L22 in conferring macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 3893-6.
42. **Caldwell D.B., Wang Y., and Lin J.** 2008. Development, stability, and molecular mechanisms of macrolide resistance in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 3947-54.

43. **Callicott K.A., Friethriksdottir V., Reiersen J., Lowman R., Bisaillon J.R., Gunnarsson E., Berndtson E., Hiett K.L., Needleman D.S., and Stern N.J.** 2006. Lack of evidence for vertical transmission of *Campylobacter* spp. in chickens. *Appl Environ Microbiol* 72: 5794-8.
44. **Callicott K.A., Hargardottir H., Georgsson F., Reiersen J., Frigriksdottir V., Gunnarsson E., Michel P., Bisaillon J.R., Kristinsson K.G., Briem H. and others.** 2008. Broiler *Campylobacter* contamination and human campylobacteriosis in Iceland. *Appl Environ Microbiol* 74: 6483-94.
45. **Camarda A., Newell D.G., Nasti R., and Di Modugno G.** 2000. Genotyping *Campylobacter jejuni* strains isolated from the gut and oviduct of laying hens. *Avian Dis* 44: 907-12.
46. **Cambau E., Bordon F., Collatz E., and Gutmann L.** 1993. Novel *gyrA* point mutation in a strain of *Escherichia coli* resistant to fluoroquinolones but not to nalidixic acid. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 1247-52.
47. **Campbell B.J., Engel A.S., Porter M.L., and Takai K.** 2006. The versatile epsilon-proteobacteria: key players in sulphidic habitats. *Nat Rev Microbiol* 4: 458-68.
48. **Cappelier J.M., Minet J., Magras C., Colwell R.R., and Federighi M.** 1999. Recovery in embryonated eggs of viable but nonculturable *Campylobacter jejuni* cells and maintenance of ability to adhere to HeLa cells after resuscitation. *Appl Environ Microbiol* 65: 5154-7.
49. **Carbonero A., Torralbo A., Borge C., Garcia-Bocanegra I., Arenas A., and Perea A.** 2012. *Campylobacter* spp., *C. jejuni* and *C. upsaliensis* infection-associated factors in healthy and ill dogs from clinics in Cordoba, Spain. Screening tests for antimicrobial susceptibility. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 35: 505-12.
50. **Cardinale E., Perrier Gros-Claude J.D., Tall F., Gueye E.F., and Salvat G.** 2005. Risk factors for contamination of ready-to-eat street-vended poultry dishes in Dakar, Senegal. *Int J Food Microbiol* 103: 157-65.
51. **Castanon J.I.** 2007. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poult Sci* 86: 2466-71.
52. **Cattoir V., Lesprit P., Lascols C., Denamur E., Legrand P., Soussy C.J., and Cambau E.** 2006. In vivo selection during ofloxacin therapy of *Escherichia coli* with combined topoisomerase mutations that confer high resistance to ofloxacin but susceptibility to nalidixic acid. *J Antimicrob Chemother* 58: 1054-7.
53. **Cawthraw S.A., and Newell D.G.** 2010. Investigation of the presence and protective effects of maternal antibodies against *Campylobacter jejuni* in chickens. *Avian Dis* 54: 86-93.
54. **Cawthraw S.A., Wassenaar T.M., Ayling R., and Newell D.G.** 1996. Increased colonization potential of *Campylobacter jejuni* strain 8116 after passage through chickens and its implication on the rate of transmission within flocks. *Epidemiol Infect* 117: 213-5.
55. **Clark C.G., Bryden L., Cuff W.R., Johnson P.L., Jamieson F., Ciebin B., and Wang G.** 2005. Use of the oxford multilocus sequence typing protocol and sequencing of the flagellin short variable region to characterize isolates from a large outbreak of waterborne *Campylobacter* sp. strains in Walkerton, Ontario, Canada. *J Clin Microbiol* 43: 2080-91.
56. **Cokal Y., Caner V., Sen A., Cetin C., and Karagenc N.** 2009. *Campylobacter* spp. and their antimicrobial resistance patterns in poultry: an epidemiological survey study in Turkey. *Zoonoses Public Health* 56: 105-10.
57. **Colles F.M., Jones T.A., McCarthy N.D., Sheppard S.K., Cody A.J., Dingle K.E., Dawkins M.S., and Maiden M.C.** 2008. *Campylobacter* infection of broiler chickens in a free-range environment. *Environ Microbiol* 10: 2042-50.
58. **Colles F.M., McCarthy N.D., Layton R., and Maiden M.C.** 2011. The Prevalence of *Campylobacter* amongst a Free-Range Broiler Breeder Flock Was Primarily Affected by Flock Age. *PLoS One* 6: e22825.
59. **Colles F.M., McCarthy N.D., Sheppard S.K., Layton R., and Maiden M.C.** 2010. Comparison of *Campylobacter* populations isolated from a free-range broiler flock before and after slaughter. *Int J Food Microbiol* 137: 259-64.
60. **Connell S.R., Tracz D.M., Nierhaus K.H., and Taylor D.E.** 2003. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 3675-81.

61. **Connerton P.L., Loc Carrillo C.M., Swift C., Dillon E., Scott A., Rees C.E., Dodd C.E., Frost J., and Connerton I.F.** 2004. Longitudinal study of *Campylobacter jejuni* bacteriophages and their hosts from broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* 70: 3877-83.
62. **Connerton P.L., Timms A.R., and Connerton I.F.** 2011. *Campylobacter* bacteriophages and bacteriophage therapy. *J Appl Microbiol* 111: 255-65.
63. **Corcoran D., Quinn T., Cotter L., and Fanning S.** 2006. An investigation of the molecular mechanisms contributing to high-level erythromycin resistance in *Campylobacter*. *Int J Antimicrob Agents* 27: 40-5.
64. **Corcoran D., Quinn T., Cotter L., Whyte P., and Fanning S.** 2006. Antimicrobial resistance profiling and fla-typing of Irish thermophilic *Campylobacter* spp. of human and poultry origin. *Lett Appl Microbiol* 43: 560-5.
65. **Corry J.E., and Atabay H.I.** 2001. Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*: 96S-114S.
66. **Cox N.A., Hofacre C.L., Bailey J.S., Buhr R.J., Wilson J.L., Hiatt K.L., Richardson L.J., Musgrove M.T., Cosby D.E., Tankson J.D. and others.** 2005. Presence of *Campylobacter jejuni* in various organs one hour, one day, and one week following oral or intraoal inoculations of broiler chicks. *Avian Dis* 49: 155-8.
67. **Cox N.A., Stern N.J., Hiatt K.L., and Berrang M.E.** 2002. Identification of a new source of *Campylobacter* contamination in poultry: transmission from breeder hens to broiler chickens. *Avian Dis* 46: 535-41.
68. **Crum N.F.** 2003. Current trends in typhoid Fever. *Curr Gastroenterol Rep* 5: 279-86.
69. **Cuomo A., Dipineto L., Santaniello A., Matteoli G., Sarli T., Vecchia D.D., Fioretti A., and Menna L.F.** 2007. Detection of thermotolerant *Campylobacter* in ostriches (*Struthio camelus*) in Italy. *Vet J* 174: 439-41.
70. **Chaban B., Ngeleka M., and Hill J.E.** 2010. Detection and quantification of 14 *Campylobacter* species in pet dogs reveals an increase in species richness in feces of diarrheic animals. *BMC Microbiol* 10: 73.
71. **Chan K., Elhanafi D., and Kathariou S.** 2008. Genomic evidence for interspecies acquisition of chromosomal DNA from *Campylobacter jejuni* by *Campylobacter coli* strains of a turkey-associated clonal group (cluster II). *Foodborne Pathog Dis* 5: 387-98.
72. **Chen X., Naren G.W., Wu C.M., Wang Y., Dai L., Xia L.N., Luo P.J., Zhang Q., and Shen J.Z.** 2010. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates in broilers from China. *Vet Microbiol* 144: 133-9.
73. **Chua K., Gurtler V., Montgomery J., Fraenkel M., Mayall B.C., and Grayson M.L.** 2007. *Campylobacter insulaenigrae* causing septicaemia and enteritis. *J Med Microbiol* 56: 1565-7.
74. **Chuma T., Hashimoto S., and Okamoto K.** 2000. Detection of thermophilic *Campylobacter* from sparrows by multiplex PCR: the role of sparrows as a source of contamination of broilers with *Campylobacter*. *J Vet Med Sci* 62: 1291-5.
75. **Chuma T., Yamada T., Yano K., Okamoto K., and Yugi H.** 1994. A survey of *Campylobacter jejuni* in broilers from assignment to slaughter using DNA-DNA hybridization. *J Vet Med Sci* 56: 697-700.
76. **Chuma T., Yano K., Omori H., Okamoto K., and Yugi H.** 1997. Direct detection of *Campylobacter jejuni* in chicken cecal contents by PCR. *J Vet Med Sci* 59: 85-7.
77. **D'Lima C B., Miller W.G., Mandrell R.E., Wright S.L., Siletzky R.M., Carver D.K., and Kathariou S.** 2007. Clonal population structure and specific genotypes of multidrug-resistant *Campylobacter coli* from Turkeys. *Appl Environ Microbiol* 73: 2156-64.
78. **Dailidienė D., Bertoli M.T., Miciuleviciene J., Mukhopadhyay A.K., Dailide G., Pascasio M.A., Kupcinskis L., and Berg D.E.** 2002. Emergence of tetracycline resistance in *Helicobacter pylori*: multiple mutational changes in 16S ribosomal DNA and other genetic loci. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 3940-6.
79. **Davies R.H., Teale C.J., Wray C., McLaren I.M., Jones Y.E., Chappell S., and Kidd S.** 1999. Nalidixic acid resistance in salmonellae isolated from turkeys and other livestock in Great Britain. *Vet Rec* 144: 320-2.
80. **Davydova N., Streltsov V., Wilce M., Liljas A., and Garber M.** 2002. L22 ribosomal protein and effect of its mutation on ribosome resistance to erythromycin. *J Mol Biol* 322: 635-44.

81. **De Groote V.N., Fauvart M., Kint C.I., Verstraeten N., Jans A., Cornelis P., and Michiels J.** 2011. *Pseudomonas aeruginosa* fosfomycin resistance mechanisms affect non-inherited fluoroquinolone tolerance. *J Med Microbiol* 60: 329-36.
82. **de Haan C.P., Kivisto R., Hakkinen M., Rautelin H., and Hanninen M.L.** 2010. Decreasing trend of overlapping multilocus sequence types between human and chicken *Campylobacter jejuni* isolates over a decade in Finland. *Appl Environ Microbiol* 76: 5228-36.
83. **de Haan C.P., Kivisto R.I., Hakkinen M., Corander J., and Hanninen M.L.** 2010. Multilocus sequence types of Finnish bovine *Campylobacter jejuni* isolates and their attribution to human infections. *BMC Microbiol* 10: 200.
84. **de Jong A., Thomas V., Simjee S., Godinho K., Schiessl B., Klein U., Butty P., Valle M., Marion H., and Shryock T.R.** 2012. Pan-European monitoring of susceptibility to human-use antimicrobial agents in enteric bacteria isolated from healthy food-producing animals. *J Antimicrob Chemother* 67: 638-51.
85. **Debruyne L., Broman T., Bergstrom S., Olsen B., On S.L., and Vandamme P.** 2010. *Campylobacter subantarcticus* sp. nov., isolated from birds in the sub-Antarctic region. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 815-9.
86. **Debruyne L., Broman T., Bergstrom S., Olsen B., On S.L., and Vandamme P.** 2010. *Campylobacter volucris* sp. nov., isolated from black-headed gulls (*Larus ridibundus*). *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 1870-5.
87. **Debruyne L., On S.L., De Brandt E., and Vandamme P.** 2009. Novel *Campylobacter lari*-like bacteria from humans and molluscs: description of *Campylobacter peloridis* sp. nov., *Campylobacter lari* subsp. *concheus* subsp. nov. and *Campylobacter lari* subsp. *lari* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 1126-32.
88. **Denis M., Chidaine B., Laisney M.J., Kempf I., Rivoal K., Megraud F., and Fravalo P.** 2009. Comparison of genetic profiles of *Campylobacter* strains isolated from poultry, pig and *Campylobacter* human infections in Brittany, France. *Pathol Biol (Paris)* 57: 23-9.
89. **Denis M., Rose V., Huneau-Salaun A., Balaine L., and Salvat G.** 2008. Diversity of pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from broiler chickens in France. *Poult Sci* 87: 1662-71.
90. **Desai M., Logan J.M., Frost J.A., and Stanley J.** 2001. Genome sequence-based fluorescent amplified fragment length polymorphism of *Campylobacter jejuni*, its relationship to serotyping, and its implications for epidemiological analysis. *J Clin Microbiol* 39: 3823-9.
91. **Desmonts M.H., Dufour-Gesbert F., Avrain L., and Kempf I.** 2004. Antimicrobial resistance in *Campylobacter* strains isolated from French broilers before and after antimicrobial growth promoter bans. *J Antimicrob Chemother* 54: 1025-30.
92. **Diaz-Torres M.L., McNab R., Spratt D.A., Villedieu A., Hunt N., Wilson M., and Mullany P.** 2003. Novel tetracycline resistance determinant from the oral metagenome. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 1430-2.
93. **Dingle K.E., Colles F.M., Falush D., and Maiden M.C.** 2005. Sequence typing and comparison of population biology of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* 43: 340-7.
94. **Dingle K.E., Colles F.M., Ure R., Wagenaar J.A., Duim B., Bolton F.J., Fox A.J., Wareing D.R., and Maiden M.C.** 2002. Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* clones: a basis for epidemiologic investigation. *Emerg Infect Dis* 8: 949-55.
95. **Dingle K.E., Colles F.M., Wareing D.R., Ure R., Fox A.J., Bolton F.E., Bootsma H.J., Willems R.J., Urwin R., and Maiden M.C.** 2001. Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* 39: 14-23.
96. **Djordjevic S.P., Unicomb L.E., Adamson P.J., Mickan L., and Rios R.** 2007. Clonal complexes of *Campylobacter jejuni* identified by multilocus sequence typing are reliably predicted by restriction fragment length polymorphism analyses of the *flaA* gene. *J Clin Microbiol* 45: 102-8.
97. **Doorduyn Y., Van Den Brandhof W.E., Van Duynhoven Y.T., Breukink B.J., Wagenaar J.A., and Van Pelt W.** 2010. Risk factors for indigenous *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections in The Netherlands: a case-control study. *Epidemiol Infect* 138: 1391-404.
98. **Dougherty T.J., Beaulieu D., and Barrett J.F.** 2001. New quinolones and the impact on resistance. *Drug Discov Today* 6: 529-536.

99. **Duff S.B., Scott E.A., Mafilios M.S., Todd E.C., Krilov L.R., Geddes A.M., and Ackerman S.J.** 2003. Cost-effectiveness of a targeted disinfection program in household kitchens to prevent foodborne illnesses in the United States, Canada, and the United Kingdom. *J Food Prot* 66: 2103-15.
100. **Duim B., Godschalk P.C., van den Braak N., Dingle K.E., Dijkstra J.R., Leyde E., van der Plas J., Colles F.M., Endtz H.P., Wagenaar J.A. and others.** 2003. Molecular evidence for dissemination of unique *Campylobacter jejuni* clones in Curacao, Netherlands Antilles. *J Clin Microbiol* 41: 5593-7.
101. **Duim B., Vandamme P.A., Rigter A., Laevens S., Dijkstra J.R., and Wagenaar J.A.** 2001. Differentiation of *Campylobacter* species by AFLP fingerprinting. *Microbiology* 147: 2729-37.
102. **Duim B., Wassenaar T.M., Rigter A., and Wagenaar J.** 1999. High-resolution genotyping of *Campylobacter* strains isolated from poultry and humans with amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Appl Environ Microbiol* 65: 2369-75.
103. **Edmonds P., Patton C.M., Griffin P.M., Barrett T.J., Schmid G.P., Baker C.N., Lambert M.A., and Brenner D.J.** 1987. *Campylobacter hyointestinalis* associated with human gastrointestinal disease in the United States. *J Clin Microbiol* 25: 685-91.
104. **EFSA.** 2008. Harmonised monitoring of antimicrobial resistance in *Salmonella* and *Campylobacter* isolates from food animals in the European Union. *Clin Microbiol Infect* 14: 522-33.
105. **Ekdahl K., Normann B., and Andersson Y.** 2005. Could flies explain the elusive epidemiology of campylobacteriosis? *BMC Infect Dis* 5: 11.
106. **Ellis-Iversen J., Ridley A., Morris V., Sowa A., Harris J., Atterbury R., Sparks N., and Allen V.** 2011. Persistent environmental reservoirs on farms as risk factors for *Campylobacter* in commercial poultry. *Epidemiol Infect*: 1-9.
107. **Engberg J., Aarestrup F.M., Taylor D.E., Gerner-Smidt P., and Nachamkin I.** 2001. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerg Infect Dis* 7: 24-34.
108. **Engberg J., On S.L., Harrington C.S., and Gerner-Smidt P.** 2000. Prevalence of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter*, and *Sutterella* spp. in human fecal samples as estimated by a reevaluation of isolation methods for Campylobacters. *J Clin Microbiol* 38: 286-91.
109. **Eppinger M., Baar C., Raddatz G., Huson D.H., and Schuster S.C.** 2004. Comparative analysis of four *Campylobacteriales*. *Nat Rev Microbiol* 2: 872-85.
110. **Ethelberg S., Olsen K.E., Gerner-Smidt P., and Molbak K.** 2004. Household outbreaks among culture-confirmed cases of bacterial gastrointestinal disease. *Am J Epidemiol* 159: 406-12.
111. **Ewnetu D., and Mihret A.** 2010. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates from humans and chickens in Bahir Dar, Ethiopia. *Foodborne Pathog Dis* 7: 667-70.
112. **Fairchild A.S., Smith J.L., Idris U., Lu J., Sanchez S., Purvis L.B., Hofacre C., and Lee M.D.** 2005. Effects of orally administered tetracycline on the intestinal community structure of chickens and on tet determinant carriage by commensal bacteria and *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol* 71: 5865-72.
113. **Fakhr M.K., Nolan L.K., and Logue C.M.** 2005. Multilocus sequence typing lacks the discriminatory ability of pulsed-field gel electrophoresis for typing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Clin Microbiol* 43: 2215-9.
114. **Fang S.W., Yang C.J., Shih D.Y., Chou C.C., and Yu R.C.** 2006. Amplified fragment length polymorphism, serotyping, and quinolone resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains from chicken-related samples and humans in Taiwan. *J Food Prot* 69: 775-83.
115. **Fernandez F., Sharma R., Hinton M., and Bedford M.R.** 2000. Diet influences the colonisation of *Campylobacter jejuni* and distribution of mucin carbohydrates in the chick intestinal tract. *Cell Mol Life Sci* 57: 1793-801.
116. **Fertner M.E., Olsen R.H., Bisgaard M., and Christensen H.** 2011. Transmission and genetic diversity of *Enterococcus faecalis* among layer chickens during hatch. *Acta Vet Scand* 53: 56.
117. **Fife M.S., Howell J.S., Salmon N., Hocking P.M., van Diemen P.M., Jones M.A., Stevens M.P., and Kaiser P.** 2010. Genome-wide SNP analysis identifies major QTL for *Salmonella* colonization in the chicken. *Anim Genet*.

118. **Fitzgerald C., Helsel L.O., Nicholson M.A., Olsen S.J., Swerdlow D.L., Flahart R., Sexton J., and Fields P.I.** 2001. Evaluation of methods for subtyping *Campylobacter jejuni* during an outbreak involving a food handler. *J Clin Microbiol* 39: 2386-90.
119. **Fonseca B.B., Beletti M.E., Melo R.T., Mendonca E.P., Vieira C.U., Levenhagen M.A., and Rossi D.A.** 2011. Transfer, viability and colonisation of *Campylobacter jejuni* in the chicken vitellus and in embryos. *Br Poult Sci* 52: 279-86.
120. **Fouts D.E., Mongodin E.F., Mandrell R.E., Miller W.G., Rasko D.A., Ravel J., Brinkac L.M., DeBoy R.T., Parker C.T., Daugherty S.C. and others.** 2005. Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple *Campylobacter* species. *PLoS Biol* 3: e15.
121. **Friis L.M., Pin C., Taylor D.E., Pearson B.M., and Wells J.M.** 2007. A role for the *tet(O)* plasmid in maintaining *Campylobacter* plasticity. *Plasmid* 57: 18-28.
122. **Frost J.A.** 2001. Current epidemiological issues in human campylobacteriosis. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*: 85S-95S.
123. **Frost J.A., Kramer J.M., and Gillanders S.A.** 1999. Phage typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* and its use as an adjunct to serotyping. *Epidemiol Infect* 123: 47-55.
124. **Fullerton K.E., Ingram L.A., Jones T.F., Anderson B.J., McCarthy P.V., Hurd S., Shiferaw B., Vugia D., Haubert N., Hayes T. and others.** 2007. Sporadic campylobacter infection in infants: a population-based surveillance case-control study. *Pediatr Infect Dis J* 26: 19-24.
125. **Fussing V., Moller Nielsen E., Neimann J., and Engberg J.** 2007. Systematic serotyping and ribotyping of *Campylobacter* spp. improves surveillance: experiences from two Danish counties. *Clin Microbiol Infect* 13: 635-42.
126. **Gardner T.J., Fitzgerald C., Xavier C., Klein R., Pruckler J., Stroika S., and McLaughlin J.B.** 2011. Outbreak of campylobacteriosis associated with consumption of raw peas. *Clin Infect Dis* 53: 26-32.
127. **Ge B., McDermott P.F., White D.G., and Meng J.** 2005. Role of efflux pumps and topoisomerase mutations in fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 3347-54.
128. **Ge B., White D.G., McDermott P.F., Girard W., Zhao S., Hubert S., and Meng J.** 2003. Antimicrobial-resistant *Campylobacter* species from retail raw meats. *Appl Environ Microbiol* 69: 3005-7.
129. **Gibreel A., Kos V.N., Keelan M., Trieber C.A., Levesque S., Michaud S., and Taylor D.E.** 2005. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: molecular mechanism and stability of the resistance phenotype. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 2753-9.
130. **Gibreel A., Skold O., and Taylor D.E.** 2004. Characterization of plasmid-mediated *aphA-3* kanamycin resistance in *Campylobacter jejuni*. *Microb Drug Resist* 10: 98-105.
131. **Gibreel A., and Taylor D.E.** 2006. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Antimicrob Chemother* 58: 243-55.
132. **Gibreel A., Tracz D.M., Nonaka L., Ngo T.M., Connell S.R., and Taylor D.E.** 2004. Incidence of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* isolated in Alberta, Canada, from 1999 to 2002, with special reference to *tet(O)*-mediated tetracycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 3442-50.
133. **Gilbert M., Godschalk P.C., Karwaski M.F., Ang C.W., van Belkum A., Li J., Wakarchuk W.W., and Endtz H.P.** 2004. Evidence for acquisition of the lipooligosaccharide biosynthesis locus in *Campylobacter jejuni* GB11, a strain isolated from a patient with Guillain-Barre syndrome, by horizontal exchange. *Infect Immun* 72: 1162-5.
134. **Gilbreath J.J., Cody W.L., Merrell D.S., and Hendrixson D.R.** 2011. Change is good: variations in common biological mechanisms in the epsilonproteobacterial genera *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Microbiol Mol Biol Rev* 75: 84-132.
135. **Gilpin B., Cornelius A., Robson B., Boxall N., Ferguson A., Nicol C., and Henderson T.** 2006. Application of pulsed-field gel electrophoresis to identify potential outbreaks of campylobacteriosis in New Zealand. *J Clin Microbiol* 44: 406-12.

136. Gillespie I.A., O'Brien S.J., Frost J.A., Adak G.K., Horby P., Swan A.V., Painter M.J., and Neal K.R. 2002. A case-case comparison of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* infection: a tool for generating hypotheses. *Emerg Infect Dis* 8: 937-42.
137. Goossens H., Giesendorf B.A., Vandamme P., Vlaes L., Van den Borre C., Koeken A., Quint W.G., Blomme W., Hanicq P., Koster D.S. and others. 1995. Investigation of an outbreak of *Campylobacter upsaliensis* in day care centers in Brussels: analysis of relationships among isolates by phenotypic and genotypic typing methods. *J Infect Dis* 172: 1298-305.
138. Gorkiewicz G., Feierl G., Zechner R., and Zechner E.L. 2002. Transmission of *Campylobacter hyointestinalis* from a pig to a human. *J Clin Microbiol* 40: 2601-5.
139. Gormley F.J., Strachan N.J., Reay K., MacKenzie F.M., Ogden I.D., Dallas J.F., and Forbes K.J. 2010. Antimicrobial resistance profiles of *Campylobacter* from humans, retail chicken meat, and cattle feces. *Foodborne Pathog Dis* 7: 1129-31.
140. Grajewski B.A., Kusek J.W., and Gelfand H.M. 1985. Development of a bacteriophage typing system for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Clin Microbiol* 22: 13-8.
141. Griekspoor P., Engvall E.O., Olsen B., and Waldenstrom J. 2010. Multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* from broilers. *Vet Microbiol* 140: 180-5.
142. Griggs D.J., Peake L., Johnson M.M., Ghori S., Mott A., and Piddock L.J. 2009. Beta-lactamase-mediated beta-lactam resistance in *Campylobacter* species: prevalence of Cjo299 (*bla* OXA-61) and evidence for a novel beta-lactamase in *C. jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 3357-64.
143. Guerry P., Szymanski C.M., Prendergast M.M., Hickey T.E., Ewing C.P., Pattarini D.L., and Moran A.P. 2002. Phase variation of *Campylobacter jejuni* 81-176 lipooligosaccharide affects ganglioside mimicry and invasiveness in vitro. *Infect Immun* 70: 787-93.
144. Guo B., Lin J., Reynolds D.L., and Zhang Q. 2010. Contribution of the multidrug efflux transporter CmeABC to antibiotic resistance in different *Campylobacter* species. *Foodborne Pathog Dis* 7: 77-83.
145. Gupta A.K., Nayduch D., Verma P., Shah B., Ghate H.V., Patole M.S., and Shouche Y.S. 2012. Phylogenetic characterization of bacteria in the gut of house flies (*Musca domestica* L.). *FEMS Microbiol Ecol* 79: 581-93.
146. Gupta R.S. 2006. Molecular signatures (unique proteins and conserved indels) that are specific for the epsilon proteobacteria (*Campylobacterales*). *BMC Genomics* 7: 167.
147. Gyles C.L. 2008. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. *Anim Health Res Rev* 9: 149-58.
148. Hakkinen M., Nakari U.M., and Siitonen A. 2009. Chickens and cattle as sources of sporadic domestically acquired *Campylobacter jejuni* infections in Finland. *Appl Environ Microbiol* 75: 5244-9.
149. Halbert L.W., Kaneene J.B., Mansfield L.S., Ruegg P.L., Warnick L.D., Wells S.J., Fossler C.P., Campbell A.M., and Geiger-Zwald A.M. 2005. Comparison of automated microbroth dilution and agar dilution for antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* isolated from dairy sources. *J Antimicrob Chemother* 56: 686-91.
150. Hald B., Skovgard H., Pedersen K., and Bunkenborg H. 2008. Influxed insects as vectors for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Danish broiler houses. *Poult Sci* 87: 1428-34.
151. Hald B., Sommer H.M., and Skovgard H. 2007. Use of fly screens to reduce *Campylobacter* spp. introduction in broiler houses. *Emerg Infect Dis* 13: 1951-3.
152. Hald B., Wedderkopp A., and Madsen M. 2000. Thermophilic *Campylobacter* spp. in Danish broiler production: a cross-sectional survey and a retrospective analysis of risk factors for occurrence in broiler flocks. *Avian Pathol* 29: 123-31.
153. Hall G., Kirk M.D., Becker N., Gregory J.E., Unicomb L., Millard G., Stafford R., and Lalor K. 2005. Estimating foodborne gastroenteritis, Australia. *Emerg Infect Dis* 11: 1257-64.
154. Han F., Lestari S.I., Pu S., and Ge B. 2009. Prevalence and antimicrobial resistance among *Campylobacter* spp. in Louisiana retail chickens after the enrofloxacin ban. *Foodborne Pathog Dis* 6: 163-71.

155. Han J., Wang Y., Sahin O., Shen Z., Guo B., Shen J., and Zhang Q. 2012. A fluoroquinolone resistance associated mutation in *gyrA* Affects DNA supercoiling in *Campylobacter jejuni*. *Front Cell Infect Microbiol* 2: 21.
156. Hanninen M.L., Haajanen H., Pummi T., Wermundsen K., Katila M.L., Sarkkinen H., Miettinen I., and Rautelin H. 2003. Detection and typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* and analysis of indicator organisms in three waterborne outbreaks in Finland. *Appl Environ Microbiol* 69: 1391-6.
157. Hanninen M.L., Hakkinen M., and Rautelin H. 1999. Stability of related human and chicken *Campylobacter jejuni* genotypes after passage through chick intestine studied by pulsed-field gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 65: 2272-5.
158. Hanninen M.L., and Hannula M. 2007. Spontaneous mutation frequency and emergence of ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Antimicrob Chemother* 60: 1251-7.
159. Hanninen M.L., Perko-Makela P., Pitkala A., and Rautelin H. 2000. A three-year study of *Campylobacter jejuni* genotypes in humans with domestically acquired infections and in chicken samples from the Helsinki area. *J Clin Microbiol* 38: 1998-2000.
160. Hansson I., Vagsholm I., Svensson L., and Olsson Engvall E. 2007. Correlations between *Campylobacter* spp. prevalence in the environment and broiler flocks. *J Appl Microbiol* 103: 640-9.
161. Hao H., Dai M., Wang Y., Peng D., Liu Z., and Yuan Z. 2009. 23S rRNA mutation A2074C conferring high-level macrolide resistance and fitness cost in *Campylobacter jejuni*. *Microb Drug Resist* 15: 239-44.
162. Harms J., Schlutzenzen F., Zarivach R., Bashan A., Gat S., Agmon I., Bartels H., Franceschi F., and Yonath A. 2001. High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell* 107: 679-88.
163. Harrington C.S., Moran L., Ridley A.M., Newell D.G., and Madden R.H. 2003. Inter-laboratory evaluation of three flagellin PCR/RFLP methods for typing *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: the CAMPYNET experience. *J Appl Microbiol* 95: 1321-33.
164. Harrington C.S., Thomson-Carter F.M., and Carter P.E. 1997. Evidence for recombination in the flagellin locus of *Campylobacter jejuni*: implications for the flagellin gene typing scheme. *J Clin Microbiol* 35: 2386-92.
165. Haruna M., Sasaki Y., Murakami M., Ikeda A., Kusakawa M., Tsujiyama Y., Ito K., Asai T., and Yamada Y. 2012. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* in broiler flocks in Japan. *Zoonoses Public Health* 59: 241-5.
166. Hastings R., Colles F.M., McCarthy N.D., Maiden M.C., and Sheppard S.K. 2011. *Campylobacter* genotypes from poultry transportation crates indicate a source of contamination and transmission. *J Appl Microbiol* 110: 266-76.
167. Havenstein G.B., Ferket P.R., and Qureshi M.A. 2003. Growth, livability, and feed conversion of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poult Sci* 82: 1500-8.
168. Hazeleger W.C., Bolder N.M., Beumer R.R., and Jacobs-Reitsma W.F. 2008. Darkling beetles (*Alphitobius diaperinus*) and their larvae as potential vectors for the transfer of *Campylobacter jejuni* and *Salmonella enterica* serovar paratyphi B variant Java between successive broiler flocks. *Appl Environ Microbiol* 74: 6887-91.
169. Hein I., Schneck C., Knogler M., Feierl G., Pless P., Kofer J., Achmann R., and Wagner M. 2003. *Campylobacter jejuni* isolated from poultry and humans in Styria, Austria: epidemiology and ciprofloxacin resistance. *Epidemiol Infect* 130: 377-86.
170. Herschleb J., Ananiev G., and Schwartz D.C. 2007. Pulsed-field gel electrophoresis. *Nat Protoc* 2: 677-84.
171. Heuer O.E., Pedersen K., Andersen J.S., and Madsen M. 2001. Prevalence and antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* in organic and conventional broiler flocks. *Lett Appl Microbiol* 33: 269-74.
172. Heuvelink A.E., van Heerwaarden C., Zwartkruis-Nahuis A., Tilburg J.J., Bos M.H., Heilmann F.G., Hoffhuis A., Hoekstra T., and de Boer E. 2009. Two outbreaks of campylobacteriosis associated with the consumption of raw cows' milk. *Int J Food Microbiol* 134: 70-4.
173. Hiett K.L., Cox N.A., and Stern N.J. 2002. Direct polymerase chain reaction detection of *Campylobacter* spp. in poultry hatchery samples. *Avian Dis* 46: 219-23.

174. **Hiett K.L., Stern N.J., Fedorka-Cray P., Cox N.A., and Seal B.S.** 2007. Molecular phylogeny of the *flaA* short variable region among *Campylobacter jejuni* isolates collected during an annual evaluation of poultry flocks in the Southeastern United States. *Foodborne Pathog Dis* 4: 339-47.
175. **Hochman A.** 1997. Programmed cell death in prokaryotes. *Crit Rev Microbiol* 23: 207-14.
176. **Hong J., Kim J.M., Jung W.K., Kim S.H., Bae W., Koo H.C., Gil J., Kim M., Ser J., and Park Y.H.** 2007. Prevalence and antibiotic resistance of *Campylobacter* spp. isolated from chicken meat, pork, and beef in Korea, from 2001 to 2006. *J Food Prot* 70: 860-6.
177. **Hook H., Fattah M.A., Ericsson H., Vagsholm I., and Danielsson-Tham M.L.** 2005. Genotype dynamics of *Campylobacter jejuni* in a broiler flock. *Vet Microbiol* 106: 109-17.
178. **Hopkins K.L., Desai M., Frost J.A., Stanley J., and Logan J.M.** 2004. Fluorescent amplified fragment length polymorphism genotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains and its relationship with host specificity, serotyping, and phage typing. *J Clin Microbiol* 42: 229-35.
179. **Horrocks S.M., Anderson R.C., Nisbet D.J., and Ricke S.C.** 2009. Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. *Anaerobe* 15: 18-25.
180. **Huang J.L., Xu H.Y., Bao G.Y., Zhou X.H., Ji D.J., Zhang G., Liu P.H., Jiang F., Pan Z.M., Liu X.F. and others.** 2009. Epidemiological surveillance of *Campylobacter jejuni* in chicken, dairy cattle and diarrhoea patients. *Epidemiol Infect* 137: 1111-20.
181. **Inglis G.D., Boras V.F., and Houde A.** 2011. Enteric campylobacteria and RNA viruses associated with healthy and diarrheic humans in the Chinook health region of southwestern Alberta, Canada. *J Clin Microbiol* 49: 209-19.
182. **Inglis G.D., Kalischuk L.D., Busz H.W., and Kastelic J.P.** 2005. Colonization of cattle intestines by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter lanienae*. *Appl Environ Microbiol* 71: 5145-53.
183. **Ishihara K., Kira T., Ogikubo K., Morioka A., Kojima A., Kijima-Tanaka M., Takahashi T., and Tamura Y.** 2004. Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter* isolated from food-producing animals on farms (1999-2001): results from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. *Int J Antimicrob Agents* 24: 261-7.
184. **Jakopanec I., Borgen K., Vold L., Lund H., Forseth T., Hannula R., and Nygard K.** 2008. A large waterborne outbreak of campylobacteriosis in Norway: the need to focus on distribution system safety. *BMC Infect Dis* 8: 128.
185. **Jensen A.N., Dalsgaard A., Baggesen D.L., and Nielsen E.M.** 2006. The occurrence and characterization of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in organic pigs and their outdoor environment. *Vet Microbiol* 116: 96-105.
186. **Jensen L.B., and Aarestrup F.M.** 2001. Macrolide resistance in *Campylobacter coli* of animal origin in Denmark. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 371-2.
187. **Jeon B., Wang Y., Hao H., Barton Y.W., and Zhang Q.** 2011. Contribution of CmeG to antibiotic and oxidative stress resistance in *Campylobacter jejuni*. *J Antimicrob Chemother* 66: 79-85.
188. **Jesse T.W., Englen M.D., Pittenger-Alley L.G., and Fedorka-Cray P.J.** 2006. Two distinct mutations in *gyrA* lead to ciprofloxacin and nalidixic acid resistance in *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolated from chickens and beef cattle. *J Appl Microbiol* 100: 682-8.
189. **Jimenez M., Soler P., Venanzi J.D., Cante P., Varela C., and Martinez Navarro F.** 2005. An outbreak of *Campylobacter jejuni* enteritis in a school of Madrid, Spain. *Euro Surveill* 10: 118-21.
190. **Johnsen G., Kruse H., and Hofshagen M.** 2006. Genetic diversity and description of transmission routes for *Campylobacter* on broiler farms by amplified-fragment length polymorphism. *J Appl Microbiol* 101: 1130-9.
191. **Johnsen G., Kruse H., and Hofshagen M.** 2007. Genotyping of thermotolerant *Campylobacter* from poultry slaughterhouse by amplified fragment length polymorphism. *J Appl Microbiol* 103: 271-9.
192. **Jones F.S., Orcutt M., and Little R.B.** 1931. Vibrios (*Vibrio Jejuni*, N.Sp.) Associated with Intestinal Disorders of Cows and Calves. *J Exp Med* 53: 853-63.
193. **Jonker A., and Picard J.A.** 2010. Antimicrobial susceptibility in thermophilic *Campylobacter* species isolated from pigs and chickens in South Africa. *J S Afr Vet Assoc* 81: 228-36.

194. **Jorgensen F., Ellis-Iversen J., Rushton S., Bull S.A., Harris S.A., Bryan S.J., Gonzalez A., and Humphrey T.J.** 2011. Influence of season and geography on *Campylobacter jejuni* and *C. coli* subtypes in housed broiler flocks reared in Great Britain. *Appl Environ Microbiol* 77: 3741-8.
195. **Kalischuk L.D., and Inglis G.D.** 2011. Comparative genotypic and pathogenic examination of *Campylobacter concisus* isolates from diarrheic and non-diarrheic humans. *BMC Microbiol* 11: 53.
196. **Karczmarczyk M., Martins M., Quinn T., Leonard N., and Fanning S.** 2011. Mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from food-producing animals. *Appl Environ Microbiol* 77: 7113-20.
197. **Karenlampi R., Rautelin H., Hakkinen M., and Hanninen M.L.** 2003. Temporal and geographical distribution and overlap of Penner heat-stable serotypes and pulsed-field gel electrophoresis genotypes of *Campylobacter jejuni* isolates collected from humans and chickens in Finland during a seasonal peak. *J Clin Microbiol* 41: 4870-2.
198. **Kaur T., Singh J., Huffman M.A., Petrzelkova K.J., Taylor N.S., Xu S., Dewhirst F.E., Paster B.J., Debruyne L., Vandamme P. and others.** 2011. *Campylobacter troglodytis* sp. nov., isolated from feces of human-habituated wild chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*) in Tanzania. *Appl Environ Microbiol* 77: 2366-73.
199. **Keller J., Wieland B., Wittwer M., Stephan R., and Perreten V.** 2007. Distribution and genetic variability among *Campylobacter* spp. isolates from different animal species and humans in Switzerland. *Zoonoses Public Health* 54: 2-7.
200. **Khanna M.R., Bhavsar S.P., and Kapadnis B.P.** 2006. Effect of temperature on growth and chemotactic behaviour of *Campylobacter jejuni*. *Lett Appl Microbiol* 43: 84-90.
201. **Kinana A.D., Cardinale E., Bahsoun I., Tall F., Sire J.M., Garin B., Boye C.S., Dromigny J.A., and Perrier-Gros-Claude J.D.** 2007. Analysis of topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant and -susceptible *Campylobacter jejuni* strains isolated in Senegal. *Int J Antimicrob Agents* 29: 397-401.
202. **King C.H., Shotts E.B., Jr., Wooley R.E., and Porter K.G.** 1988. Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. *Appl Environ Microbiol* 54: 3023-33.
203. **Kirkpatrick B.D., and Tribble D.R.** 2011. Update on human *Campylobacter jejuni* infections. *Curr Opin Gastroenterol* 27: 1-7.
204. **Kittl S., Kuhnert P., Hachler H., and Korczak B.M.** 2011. Comparison of genotypes and antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from humans and slaughtered chickens in Switzerland. *J Appl Microbiol* 110: 513-520.
205. **Koga M., Gilbert M., Takahashi M., Li J., Koike S., Hirata K., and Yuki N.** 2006. Comprehensive analysis of bacterial risk factors for the development of Guillain-Barre syndrome after *Campylobacter jejuni* enteritis. *J Infect Dis* 193: 547-55.
206. **Kudirkiene E., Malakauskas M., Malakauskas A., Bojesen A.M., and Olsen J.E.** 2010. Demonstration of persistent strains of *Campylobacter jejuni* within broiler farms over a 1-year period in Lithuania. *J Appl Microbiol* 108: 868-77.
207. **Kuusi M., Nuorti J.P., Hanninen M.L., Koskela M., Jussila V., Kela E., Miettinen I., and Ruutu P.** 2005. A large outbreak of campylobacteriosis associated with a municipal water supply in Finland. *Epidemiol Infect* 133: 593-601.
208. **Labarca J.A., Sturgeon J., Borenstein L., Salem N., Harvey S.M., Lehnkering E., Reporter R., and Mascola L.** 2002. *Campylobacter upsaliensis*: Another pathogen for consideration in the United States. *Clin Infect Dis* 34: E59-60.
209. **Lang P., Lefebure T., Wang W., Pavinski Bitar P., Meinersmann R.J., Kaya K., and Stanhope M.J.** 2010. Expanded multilocus sequence typing and comparative genomic hybridization of *Campylobacter coli* isolates from multiple hosts. *Appl Environ Microbiol* 76: 1913-25.
210. **Larkin C., Van Donkersgoed C., Mahdi A., Johnson P., McNab B., and Odumeru J.** 2006. Antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from hog, beef, and chicken carcass samples from provincially inspected abattoirs in Ontario. *J Food Prot* 69: 22-6.
211. **Lastovica A.J.** 2009. Clinical relevance of *Campylobacter concisus* isolated from pediatric patients. *J Clin Microbiol* 47: 2360.

212. **Lastovica A.J., and Le Roux E.** 2001. Efficient isolation of *Campylobacter upsaliensis* from stools. *J Clin Microbiol* 39: 4222-3.
213. **Lee C.Y., Tai C.L., Lin S.C., and Chen Y.T.** 1994. Occurrence of plasmids and tetracycline resistance among *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from whole market chickens and clinical samples. *Int J Food Microbiol* 24: 161-70.
214. **Lee M.D., and Newell D.G.** 2006. *Campylobacter* in poultry: filling an ecological niche. *Avian Dis* 50: 1-9.
215. **Lehtopolku M., Kotilainen P., Haanpera-Heikkinen M., Nakari U.M., Hanninen M.L., Huovinen P., Siitonen A., Eerola E., Jalava J., and Hakanen A.J.** 2011. Ribosomal mutations as the main cause of macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 5939-41.
216. **Lehtopolku M., Kotilainen P., Puukka P., Nakari U.M., Siitonen A., Eerola E., Huovinen P., and Hakanen A.J.** 2012. Inaccuracy of the disk diffusion method compared with the agar dilution method for susceptibility testing of *Campylobacter* spp. *J Clin Microbiol* 50: 52-6.
217. **Lehtopolku M., Nakari U.M., Kotilainen P., Huovinen P., Siitonen A., and Hakanen A.J.** 2010. Antimicrobial susceptibilities of multidrug-resistant *Campylobacter jejuni* and *C. coli* strains: in vitro activities of 20 antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 1232-6.
218. **Levesque S., Frost E., Arbeit R.D., and Michaud S.** 2008. Multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* isolates from humans, chickens, raw milk, and environmental water in Quebec, Canada. *J Clin Microbiol* 46: 3404-11.
219. **Levine C., Hiasa H., and Mariani K.J.** 1998. DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. *Biochim Biophys Acta* 1400: 29-43.
220. **Levy A.J.** 1946. A gastro-enteritis outbreak probably due to a bovine strain of vibrio. *Yale J Biol Med* 18: 243-58.
221. **Lin J., Akiba M., Sahin O., and Zhang Q.** 2005. CmeR functions as a transcriptional repressor for the multidrug efflux pump CmeABC in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 1067-75.
222. **Lin J., Cagliero C., Guo B., Barton Y.W., Maurel M.C., Payot S., and Zhang Q.** 2005. Bile salts modulate expression of the CmeABC multidrug efflux pump in *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol* 187: 7417-24.
223. **Lin J., Yan M., Sahin O., Pereira S., Chang Y.J., and Zhang Q.** 2007. Effect of macrolide usage on emergence of erythromycin-resistant *Campylobacter* isolates in chickens. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 1678-86.
224. **Lindmark H., Harbom B., Thebo L., Andersson L., Hedin G., Osterman B., Lindberg T., Andersson Y., Westoo A., and Olsson Engvall E.** 2004. Genetic characterization and antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from meats, water, and humans in Sweden. *J Clin Microbiol* 42: 700-6.
225. **Line J.E.** 2001. Development of a selective differential agar for isolation and enumeration of *Campylobacter* spp. *J Food Prot* 64: 1711-5.
226. **Lior H., Woodward D.L., Edgar J.A., Laroche L.J., and Gill P.** 1982. Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. *J Clin Microbiol* 15: 761-8.
227. **Little C.L., Gormley F.J., Rawal N., and Richardson J.F.** 2010. A recipe for disaster: outbreaks of campylobacteriosis associated with poultry liver pate in England and Wales. *Epidemiol Infect* 138: 1691-4.
228. **Love D.C., Davis M.F., Bassett A., Gunther A., and Nachman K.E.** 2011. Dose imprecision and resistance: free-choice medicated feeds in industrial food animal production in the United States. *Environ Health Perspect* 119: 279-83.
229. **Luangtongkum T., Jeon B., Han J., Plummer P., Logue C.M., and Zhang Q.** 2009. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. *Future Microbiol* 4: 189-200.
230. **Luangtongkum T., Shen Z., Seng V.W., Sahin O., Jeon B., Liu P., and Zhang Q.** 2012. Impaired fitness and transmission of macrolide-resistant *Campylobacter jejuni* in its natural host. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 1300-8.
231. **Luber P., Wagner J., Hahn H., and Bartelt E.** 2003. Antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated in 1991 and 2001-2002 from poultry and humans in Berlin, Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 3825-30.

232. **Lukinmaa S., Nakari U.M., Eklund M., and Siitonen A.** 2004. Application of molecular genetic methods in diagnostics and epidemiology of food-borne bacterial pathogens. *APMIS* 112: 908-29.
233. **Luo N., Pereira S., Sahin O., Lin J., Huang S., Michel L., and Zhang Q.** 2005. Enhanced in vivo fitness of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter jejuni* in the absence of antibiotic selection pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 541-6.
234. **Luo N., Sahin O., Lin J., Michel L.O., and Zhang Q.** 2003. In vivo selection of *Campylobacter* isolates with high levels of fluoroquinolone resistance associated with *gyrA* mutations and the function of the CmeABC efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 390-4.
235. **Lynch O.A., Cagney C., McDowell D.A., and Duffy G.** 2010. A method for the growth and recovery of 17 species of *Campylobacter* and its subsequent application to inoculated beef. *J Microbiol Methods* 83: 1-7.
236. **Magnusson S.H., Guethmundsdottir S., Reynisson E., Runarsson A.R., Harethardottir H., Gunnarson E., Georgsson F., Reiersen J., and Marteinsson V.T.** 2011. Comparison of *Campylobacter jejuni* isolates from human, food, veterinary and environmental sources in Iceland using PFGE, MLST and fla-SVR sequencing. *J Appl Microbiol*.
237. **Maiden M.C., Bygraves J.A., Feil E., Morelli G., Russell J.E., Urwin R., Zhang Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D.A. and others.** 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 3140-5.
238. **Man S.M.** 2011. The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8: 669-85.
239. **Man S.M., Zhang L., Day A.S., Leach S.T., Lemberg D.A., and Mitchell H.** *Campylobacter concisus* and other *Campylobacter* species in children with newly diagnosed Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 16: 1008-16.
240. **Manavathu E.K., Hiratsuka K., and Taylor D.E.** 1988. Nucleotide sequence analysis and expression of a tetracycline-resistance gene from *Campylobacter jejuni*. *Gene* 62: 17-26.
241. **Manning G., Dowson C.G., Bagnall M.C., Ahmed I.H., West M., and Newell D.G.** 2003. Multilocus sequence typing for comparison of veterinary and human isolates of *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol* 69: 6370-9.
242. **Martinez-Martinez L., Pascual A., and Jacoby G.A.** 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 351: 797-9.
243. **Matsheka M.I., Elisha B.G., Lastovica A.L., and On S.L.** 2002. Genetic heterogeneity of *Campylobacter concisus* determined by pulsed field gel electrophoresis-based macrorestriction profiling. *FEMS Microbiol Lett* 211: 17-22.
244. **Mattheus W., Botteldoorn N., Heylen K., Pochet B., and Dierick K.** 2012. Trend analysis of antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from Belgian pork and poultry meat products using surveillance data of 2004-2009. *Foodborne Pathog Dis* 9: 465-72.
245. **Mazick A., Ethelberg S., Nielsen E.M., Mølbak K., and Lisby M.** 2006. An outbreak of *Campylobacter jejuni* associated with consumption of chicken, Copenhagen, 2005. *Euro Surveill* 11: 137-9.
246. **McGill K., Cowley D., Moran L., Scates P., O'Leary A., Madden R.H., Carroll C., McNamara E., Moore J.E., Fanning S. and others.** 2006. Antibiotic resistance of retail food and human *Campylobacter* isolates on the island of Ireland from 2001-2002. *Epidemiol Infect* 134: 1282-91.
247. **McTavish S.M., Pope C.E., Nicol C., Sexton K., French N., and Carter P.E.** 2008. Wide geographical distribution of internationally rare *Campylobacter* clones within New Zealand. *Epidemiol Infect* 136: 1244-52.
248. **Mead P.S., Slutsker L., Dietz V., McCaig L.F., Bresee J.S., Shapiro C., Griffin P.M., and Tauxe R.V.** 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5: 607-25.
249. **Meinersmann R.J., Helsel L.O., Fields P.I., and Hiatt K.L.** 1997. Discrimination of *Campylobacter jejuni* isolates by fla gene sequencing. *J Clin Microbiol* 35: 2810-4.
250. **Melero B., Juntunen P., Hanninen M.L., Jaime I., and Rovira J.** 2012. Tracing *Campylobacter jejuni* strains along the poultry meat production chain from farm to retail by pulsed-field gel electrophoresis, and the antimicrobial resistance of isolates. *Food Microbiol* 32: 124-8.

251. **Merchant-Patel S., Blackall P.J., Templeton J., Price E.P., Tong S.Y., Huygens F., and Giffard P.M.** 2010. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* genotyping by high-resolution melting analysis of a *flaA* fragment. *Appl Environ Microbiol* 76: 493-9.
252. **Messens W., Herman L., De Zutter L., and Heyndrickx M.** 2009. Multiple typing for the epidemiological study of contamination of broilers with thermotolerant *Campylobacter*. *Vet Microbiol* 138: 120-31.
253. **Michaud S., Menard S., Gaudreau C., and Arbeit R.D.** 2001. Comparison of *Sma*I-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by *Kpn*I: a population-based study. *J Med Microbiol* 50: 1075-81.
254. **Miflin J.K., Templeton J.M., and Blackall P.J.** 2007. Antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from poultry in the South-East Queensland region. *J Antimicrob Chemother* 59: 775-8.
255. **Miller W.G., Englen M.D., Kathariou S., Wesley I.V., Wang G., Pittenger-Alley L., Siletz R.M., Muraoka W., Fedorka-Cray P.J., and Mandrell R.E.** 2006. Identification of host-associated alleles by multilocus sequence typing of *Campylobacter coli* strains from food animals. *Microbiology* 152: 245-55.
256. **Miller W.G., On S.L., Wang G., Fontanoz S., Lastovica A.J., and Mandrell R.E.** 2005. Extended multilocus sequence typing system for *Campylobacter coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. helveticus*. *J Clin Microbiol* 43: 2315-29.
257. **Montrose M.S., Shane S.M., and Harrington K.S.** 1985. Role of litter in the transmission of *Campylobacter jejuni*. *Avian Dis* 29: 392-9.
258. **Moore J.E., Barton M.D., Blair I.S., Corcoran D., Dooley J.S., Fanning S., Kempf I., Lastovica A.J., Lowery C.J., Matsuda M. and others.** 2006. The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. *Microbes Infect* 8: 1955-66.
259. **Myers J.D., and Kelly D.J.** 2005. A sulphite respiration system in the chemoheterotrophic human pathogen *Campylobacter jejuni*. *Microbiology* 151: 233-42.
260. **Nachamkin I., Bohachick K., and Patton C.M.** 1993. Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 31: 1531-6.
261. **Nachamkin I., Ung H., and Li M.** 2002. Increasing fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni*, Pennsylvania, USA, 1982-2001. *Emerg Infect Dis* 8: 1501-3.
262. **Nakamura S., Maeda N., Miron I.M., Yoh M., Izutsu K., Kataoka C., Honda T., Yasunaga T., Nakaya T., Kawai J. and others.** 2008. Metagenomic diagnosis of bacterial infections. *Emerg Infect Dis* 14: 1784-6.
263. **Nakari U.M., Huovinen E., Kuusi M., and Siitonen A.** 2010. Population-based surveillance study of *Campylobacter* infections in Finland. *Epidemiol Infect* 138: 1712-8.
264. **Nakari U.M., Puhakka A., and Siitonen A.** 2008. Correct identification and discrimination between *Campylobacter jejuni* and *C. coli* by a standardized hippurate test and species-specific polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27: 513-8.
265. **Nesbit E.G., Gibbs P., Dreesen D.W., and Lee M.D.** 2001. Epidemiologic features of *Campylobacter jejuni* isolated from poultry broiler houses and surrounding environments as determined by use of molecular strain typing. *Am J Vet Res* 62: 190-4.
266. **Newell D.G., and Fearnley C.** 2003. Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* 69: 4343-51.
267. **Nielsen E.M.** 2002. Occurrence and strain diversity of thermophilic campylobacters in cattle of different age groups in dairy herds. *Lett Appl Microbiol* 35: 85-9.
268. **Nielsen E.M., Engberg J., and Madsen M.** 1997. Distribution of serotypes of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from Danish patients, poultry, cattle and swine. *FEMS Immunol Med Microbiol* 19: 47-56.
269. **Nielsen E.M., and Nielsen N.L.** 1999. Serotypes and typability of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from poultry products. *Int J Food Microbiol* 46: 199-205.
270. **Nielsen L.N., Sheppard S.K., McCarthy N.D., Maiden M.C., Ingmer H., and Krogfelt K.A.** 2010. MLST clustering of *Campylobacter jejuni* isolates from patients with gastroenteritis, reactive arthritis and Guillain-Barre syndrome. *J Appl Microbiol* 108: 591-9.

271. **Nirdnoy W., Mason C.J., and Guerry P.** 2005. Mosaic structure of a multiple-drug-resistant, conjugative plasmid from *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 2454-9.
272. **Norstrom M., Johnsen G., Hofshagen M., Tharaldsen H., and Kruse H.** 2007. Antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* from broilers and broiler house environments in Norway. *J Food Prot* 70: 736-8.
273. **Nuijten P.J., van Asten F.J., Gaastra W., and van der Zeijst B.A.** 1990. Structural and functional analysis of two *Campylobacter jejuni* flagellin genes. *J Biol Chem* 265: 17798-804.
274. **O'Mahony E., Buckley J.F., Bolton D., Whyte P., and Fanning S.** 2011. Molecular epidemiology of campylobacter isolates from poultry production units in southern ireland. *PLoS One* 6: e28490.
275. **Obeng A.S., Rickard H., Sexton M., Pang Y., Peng H., and Barton M.** 2012. Antimicrobial susceptibilities and resistance genes in *Campylobacter* strains isolated from poultry and pigs in Australia. *J Appl Microbiol* 113: 294-307.
276. **Ogden I.D., MacRae M., Johnston M., Strachan N.J., Cody A.J., Dingle K.E., and Newell D.G.** 2007. Use of multilocus sequence typing to investigate the association between the presence of *Campylobacter* spp. in broiler drinking water and *Campylobacter* colonization in broilers. *Appl Environ Microbiol* 73: 5125-9.
277. **Oh J.Y., Kang M.S., An B.K., Song E.A., Kwon J.H., and Kwon Y.K.** 2010. Occurrence of purulent arthritis broilers vertically infected with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in Korea. *Poult Sci* 89: 2116-22.
278. **Olsen S.J., Hansen G.R., Bartlett L., Fitzgerald C., Sonder A., Manjrekar R., Riggs T., Kim J., Flahart R., Pezzino G. and others.** 2001. An outbreak of *Campylobacter jejuni* infections associated with food handler contamination: the use of pulsed-field gel electrophoresis. *J Infect Dis* 183: 164-7.
279. **On S.L.** 1998. In vitro genotypic variation of *Campylobacter coli* documented by pulsed-field gel electrophoretic DNA profiling: implications for epidemiological studies. *FEMS Microbiol Lett* 165: 341-6.
280. **On S.L.** 2001. Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*: 1S-15S.
281. **On S.L., Nielsen E.M., Engberg J., and Madsen M.** 1998. Validity of *Sma*I-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by *Sall*I, *Kpn*I, and *Bam*HI polymorphisms: evidence of identical clones infecting humans, poultry, and cattle. *Epidemiol Infect* 120: 231-7.
282. **Ono K., Kurazono T., Niwa H., and Itoh K.** 2003. Comparison of three methods for epidemiological typing of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Curr Microbiol* 47: 364-71.
283. **Oporto B., Juste R.A., Lopez-Portoles J.A., and Hurtado A.** 2011. Genetic diversity among *Campylobacter jejuni* isolates from healthy livestock and their links to human isolates in Spain. *Zoonoses Public Health* 58: 365-75.
284. **Parker C.T., Miller W.G., Horn S.T., and Lastovica A.J.** 2007. Common genomic features of *Campylobacter jejuni* subsp. *doylei* strains distinguish them from *C. jejuni* subsp. *jejuni*. *BMC Microbiol* 7: 50.
285. **Parker C.T., Quinones B., Miller W.G., Horn S.T., and Mandrell R.E.** 2006. Comparative genomic analysis of *Campylobacter jejuni* strains reveals diversity due to genomic elements similar to those present in *C. jejuni* strain RM1221. *J Clin Microbiol* 44: 4125-35.
286. **Parkhill J., Wren B.W., Mungall K., Ketley J.M., Churcher C., Basham D., Chillingworth T., Davies R.M., Feltwell T., Holroyd S. and others.** 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* 403: 665-8.
287. **Patriarchi A., Fox A., Maunsell B., Fanning S., and Bolton D.** 2011. Molecular characterization and environmental mapping of *Campylobacter* isolates in a subset of intensive poultry flocks in Ireland. *Foodborne Pathog Dis* 8: 99-108.
288. **Patriarchi A., Maunsell B., O'Mahony E., Fox A., Fanning S., Buckley J., and Bolton D.J.** 2009. Prevalence of *Campylobacter* spp. in a subset of intensive poultry flocks in Ireland. *Lett Appl Microbiol* 49: 305-10.
289. **Patrick M.E., Christiansen L.E., Waino M., Ethelberg S., Madsen H., and Wegener H.C.** 2004. Effects of climate on incidence of *Campylobacter* spp. in humans and prevalence in broiler flocks in Denmark. *Appl Environ Microbiol* 70: 7474-80.

290. **Patton C.M., Barrett T.J., and Morris G.K.** 1985. Comparison of the Penner and Lior methods for serotyping *Campylobacter* spp. *J Clin Microbiol* 22: 558-65.
291. **Payot S., Avrain L., Magras C., Praud K., Cloeckeaert A., and Chaslus-Dancla E.** 2004. Relative contribution of target gene mutation and efflux to fluoroquinolone and erythromycin resistance, in French poultry and pig isolates of *Campylobacter coli*. *Int J Antimicrob Agents* 23: 468-72.
292. **Payot S., Bolla J.M., Corcoran D., Fanning S., Megraud F., and Zhang Q.** 2006. Mechanisms of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter* spp. *Microbes Infect* 8: 1967-71.
293. **Pearson A.D., Greenwood M., Healing T.D., Rollins D., Shahamat M., Donaldson J., and Colwell R.R.** 1993. Colonization of broiler chickens by waterborne *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol* 59: 987-96.
294. **Pearson A.D., Greenwood M.H., Feltham R.K., Healing T.D., Donaldson J., Jones D.M., and Colwell R.R.** 1996. Microbial ecology of *Campylobacter jejuni* in a United Kingdom chicken supply chain: intermittent common source, vertical transmission, and amplification by flock propagation. *Appl Environ Microbiol* 62: 4614-20.
295. **Penner J.L., and Hennessy J.N.** 1980. Passive hemagglutination technique for serotyping *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* on the basis of soluble heat-stable antigens. *J Clin Microbiol* 12: 732-7.
296. **Perez-Perez G.I., and Blaser M.J.** 1996. *Campylobacter* and *Helicobacter* In: Baron S, (ed.). *Medical Microbiology* 4th edition. 2011/03/18 ed. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston (Tx).
297. **Perko-Makela P., Alter T., Isohanni P., Zimmermann S., and Lyhs U.** 2011. Distribution of *Campylobacter jejuni* isolates from Turkey Farms and Different Stages at Slaughter Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis and *flaA*-Short Variable Region Sequencing. *Zoonoses Public Health* 58: 388-98.
298. **Perko-Makela P., Hakkinen M., Honkanen-Buzalski T., and Hanninen M.L.** 2002. Prevalence of campylobacters in chicken flocks during the summer of 1999 in Finland. *Epidemiol Infect* 129: 187-92.
299. **Petersen L., and Newell D.G.** 2001. The ability of Fla-typing schemes to discriminate between strains of *Campylobacter jejuni*. *J Appl Microbiol* 91: 217-24.
300. **Petersen L., Nielsen E.M., Engberg J., On S.L., and Dietz H.H.** 2001. Comparison of genotypes and serotypes of *Campylobacter jejuni* isolated from Danish wild mammals and birds and from broiler flocks and humans. *Appl Environ Microbiol* 67: 3115-21.
301. **Petersen L., Nielsen E.M., and On S.L.** 2001. Serotype and genotype diversity and hatchery transmission of *Campylobacter jejuni* in commercial poultry flocks. *Vet Microbiol* 82: 141-54.
302. **Petersen L., and Wedderkopp A.** 2001. Evidence that certain clones of *Campylobacter jejuni* persist during successive broiler flock rotations. *Appl Environ Microbiol* 67: 2739-45.
303. **Peterson M.C.** 2003. *Campylobacter jejuni* enteritis associated with consumption of raw milk. *J Environ Health* 65: 20-1, 24, 26.
304. **Piddock L.J., Griggs D., Johnson M.M., Ricci V., Elviss N.C., Williams L.K., Jorgensen F., Chisholm S.A., Lawson A.J., Swift C. and others.** 2008. Persistence of *Campylobacter* species, strain types, antibiotic resistance and mechanisms of tetracycline resistance in poultry flocks treated with chlortetracycline. *J Antimicrob Chemother* 62: 303-15.
305. **Piddock L.J., Ricci V., Pumbwe L., Everett M.J., and Griggs D.J.** 2003. Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter* species from man and animals: detection of mutations in topoisomerase genes. *J Antimicrob Chemother* 51: 19-26.
306. **Pires S.M., Vigre H., Makela P., and Hald T.** 2010. Using outbreak data for source attribution of human salmonellosis and campylobacteriosis in Europe. *Foodborne Pathog Dis* 7: 1351-61.
307. **Pittman M.S., Elvers K.T., Lee L., Jones M.A., Poole R.K., Park S.F., and Kelly D.J.** 2007. Growth of *Campylobacter jejuni* on nitrate and nitrite: electron transport to NapA and NrfA via NrfH and distinct roles for NrfA and the globin Cgb in protection against nitrosative stress. *Mol Microbiol* 63: 575-90.
308. **Pleydell E.J., Rogers L., Kwan E., and French N.P.** 2010. Low levels of antibacterial drug resistance expressed by Gram-negative bacteria isolated from poultry carcasses in New Zealand. *N Z Vet J* 58: 229-36.

309. Poly F., Serichatalergs O., Schulman M., Ju J., Cates C.N., Kanipes M., Mason C., and Guerry P. 2011. Discrimination of major capsular types of *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. J Clin Microbiol 49: 1750-7.
310. Prats G., Mirelis B., Llovet T., Munoz C., Miro E., and Navarro F. 2000. Antibiotic resistance trends in enteropathogenic bacteria isolated in 1985-1987 and 1995-1998 in Barcelona. Antimicrob Agents Chemother 44: 1140-5.
311. Pratt A., and Korolik V. 2005. Tetracycline resistance of Australian *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. J Antimicrob Chemother 55: 452-60.
312. Preston A., Mandrell R.E., Gibson B.W., and Apicella M.A. 1996. The lipooligosaccharides of pathogenic gram-negative bacteria. Crit Rev Microbiol 22: 139-80.
313. Price E.P., Thiruvengataswamy V., Mickan L., Unicomb L., Rios R.E., Huygens F., and Giffard P.M. 2006. Genotyping of *Campylobacter jejuni* using seven single-nucleotide polymorphisms in combination with *flaA* short variable region sequencing. J Med Microbiol 55: 1061-70.
314. Price L.B., Roess A., Graham J.P., Baqar S., Vailes R., Sheikh K.A., and Silbergeld E. 2007. Neurologic symptoms and neuropathologic antibodies in poultry workers exposed to *Campylobacter jejuni*. J Occup Environ Med 49: 748-55.
315. Pumbwe L., and Piddock L.J. 2002. Identification and molecular characterisation of CmeB, a *Campylobacter jejuni* multidrug efflux pump. FEMS Microbiol Lett 206: 185-9.
316. Pumbwe L., Randall L.P., Woodward M.J., and Piddock L.J. 2004. Expression of the efflux pump genes *cmeB*, *cmeF* and the porin gene *porA* in multiple-antibiotic-resistant *Campylobacter jejuni*. J Antimicrob Chemother 54: 341-7.
317. Qin S., Wang Y., Zhang Q., Chen X., Shen Z., Deng F., Wu C., and Shen J. 2012. Identification of a novel genomic island conferring resistance to multiple aminoglycoside antibiotics in *Campylobacter coli*. Antimicrob Agents Chemother 56: 5332-9.
318. Reina J., Ros M.J., and Serra A. 1994. Susceptibilities to 10 antimicrobial agents of 1,220 *Campylobacter* strains isolated from 1987 to 1993 from feces of pediatric patients. Antimicrob Agents Chemother 38: 2917-20.
319. Retamales J. V.F., Robeson J. 2011. Insects associated with chicken manure in a breeder poultry farm of Central Chile. Arch. med. vet. 43: 79-83.
320. Ribot E.M., Fitzgerald C., Kubota K., Swaminathan B., and Barrett T.J. 2001. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. J Clin Microbiol 39: 1889-94.
321. Richardson. 1997. Integration of heterologous plasmid DNA into multiple sites on the genome of *Campylobacter coli* following natural transformation. Journal of Bacteriology 179: 1809-1812.
322. Richardson G., Thomas D.R., Smith R.M., Nehaul L., Ribeiro C.D., Brown A.G., and Salmon R.L. 2007. A community outbreak of *Campylobacter jejuni* infection from a chlorinated public water supply. Epidemiol Infect 135: 1151-8.
323. Ridley A., Morris V., Gittins J., Cawthraw S., Harris J., Edge S., and Allen V. 2011. Potential sources of *Campylobacter infection* on chicken farms: contamination and control of broiler-harvesting equipment, vehicles and personnel. J Appl Microbiol 111: 233-44.
324. Ridley A.M., Allen V.M., Sharma M., Harris J.A., and Newell D.G. 2008. Real-time PCR approach for detection of environmental sources of *Campylobacter* strains colonizing broiler flocks. Appl Environ Microbiol 74: 2492-504.
325. Rind E., and Pearce J. 2010. The spatial distribution of campylobacteriosis in New Zealand, 1997-2005. Epidemiol Infect 138: 1359-71.
326. Ring M., Zychowska M.A., and Stephan R. 2005. Dynamics of *Campylobacter* spp. spread investigated in 14 broiler flocks in Switzerland. Avian Dis 49: 390-6.
327. Rivera F.N., Bustos B.R., Montenegro H.S., Sandoval M.M., Castillo N.J., Fernandez J.H., Maturana R.M., Delgado R.L., Contreras S.A., Chavez N.D. and others. 2011. [Genotyping and antibacterial resistance of *Campylobacter* spp strains isolated in children and in free range poultry]. Rev Chilena Infectol 28: 555-62.

328. **Roberts J.A., Cumberland P., Sockett P.N., Wheeler J., Rodrigues L.C., Sethi D., and Roderick P.J.** 2003. The study of infectious intestinal disease in England: socio-economic impact. *Epidemiol Infect* 130: 1-11.
329. **Roberts M.C.** 1996. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol Rev* 19: 1-24.
330. **Roberts M.C.** 2008. Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiol Lett* 282: 147-59.
331. **Robicsek A., Strahilevitz J., Jacoby G.A., Macielag M., Abbanat D., Park C.H., Bush K., and Hooper D.C.** 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 12: 83-8.
332. **Rodriguez-Martinez J.M., Cano M.E., Velasco C., Martinez-Martinez L., and Pascual A.** 2011. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J Infect Chemother* 17: 149-82.
333. **Romero Gomez M.P., Garcia-Perea A., Ruiz Carrascoso G., Bajo M.A., and Mingorance J.** 2010. *Campylobacter fetus* peritonitis and bacteremia in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Clin Microbiol* 48: 336-7.
334. **Rossi M., Debruyne L., Zanoni R.G., Manfreda G., Revez J., and Vandamme P.** 2009. *Campylobacter avium* sp. nov., a hippurate-positive species isolated from poultry. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 2364-9.
335. **Rossi M., Hanninen M.L., Revez J., Hannula M., and Zanoni R.G.** 2008. Occurrence and species level diagnostics of *Campylobacter* spp., enteric *Helicobacter* spp. and *Anaerobiospirillum* spp. in healthy and diarrheic dogs and cats. *Vet Microbiol* 129: 304-14.
336. **Rotariu O., Smith-Palmer A., Cowden J., Bessell P.R., Innocent G.T., Reid S.W., Matthews L., Dallas J., Ogden I.D., Forbes K.J. and others.** 2010. Putative household outbreaks of campylobacteriosis typically comprise single MLST genotypes. *Epidemiol Infect* 138: 1744-7.
337. **Rozynek E., Antos-Bielska M., Dzierzanowska-Fangrat K., Szczepanska B., and Trafny E.A.** 2010. Genetic similarity of *Campylobacter* isolates in humans, food, and water sources in central Poland. *Foodborne Pathog Dis* 7: 597-600.
338. **Rozynek E., Dzierzanowska-Fangrat K., Korsak D., Konieczny P., Wardak S., Szych J., Jarosz M., and Dzierzanowska D.** 2008. Comparison of antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from humans and chicken carcasses in Poland. *J Food Prot* 71: 602-7.
339. **Rozynek E., Dzierzanowska-Fangrat K., Szczepanska B., Wardak S., Szych J., Konieczny P., Albrecht P., and Dzierzanowska D.** 2009. Trends in antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* isolates in Poland (2000-2007). *Pol J Microbiol* 58: 111-5.
340. **Ruiz J.** 2003. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother* 51: 1109-17.
341. **Ruzante J.M., Majowicz S.E., Fazil A., and Davidson V.J.** 2011. Hospitalization and deaths for select enteric illnesses and associated sequelae in Canada, 2001-2004. *Epidemiol Infect* 139: 937-45.
342. **Rysz M., Mansfield W.R., Fortner J.D., and Alvarez P.J.** 2013. Tetracycline resistance gene maintenance under varying bacterial growth rate, substrate and oxygen availability, and tetracycline concentration. *Environ Sci Technol* 47: 6995-7001.
343. **Saenz Y., Zarazaga M., Lantero M., Gastanares M.J., Baquero F., and Torres C.** 2000. Antibiotic resistance in *Campylobacter* strains isolated from animals, foods, and humans in Spain in 1997-1998. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 267-71.
344. **Sagara H., Mochizuki A., Okamura N., and Nakaya R.** 1987. Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* with special reference to plasmid profiles of Japanese clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 31: 713-9.
345. **Sahin O., Kobalka P., and Zhang Q.** 2003. Detection and survival of *Campylobacter* in chicken eggs. *J Appl Microbiol* 95: 1070-9.

346. **Sahin O., Luo N., Huang S., and Zhang Q.** 2003. Effect of *Campylobacter*-specific maternal antibodies on *Campylobacter jejuni* colonization in young chickens. *Appl Environ Microbiol* 69: 5372-9.
347. **Sahin O., Morishita T.Y., and Zhang Q.** 2002. *Campylobacter* colonization in poultry: sources of infection and modes of transmission. *Anim Health Res Rev* 3: 95-105.
348. **Sails A.D., Swaminathan B., and Fields P.I.** 2003. Clonal complexes of *Campylobacter jejuni* identified by multilocus sequence typing correlate with strain associations identified by multilocus enzyme electrophoresis. *J Clin Microbiol* 41: 4058-67.
349. **Sails A.D., Swaminathan B., and Fields P.I.** 2003. Utility of multilocus sequence typing as an epidemiological tool for investigation of outbreaks of gastroenteritis caused by *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* 41: 4733-9.
350. **Sails A.D., Wareing D.R., Bolton F.J., Fox A.J., and Curry A.** 1998. Characterisation of 16 *Campylobacter jejuni* and *C. coli* typing bacteriophages. *J Med Microbiol* 47: 123-8.
351. **Salama S.M., Bolton F.J., and Hutchinson D.N.** 1990. Application of a new phagotyping scheme to campylobacters isolated during outbreaks. *Epidemiol Infect* 104: 405-11.
352. **Samanidou V.F., and Evaggelopoulou E.N.** 2008. Chromatographic analysis of banned antibacterial growth promoters in animal feed. *J Sep Sci* 31: 2091-112.
353. **Sammarco M.L., Ripabelli G., Fanelli I., Grasso G.M., and Tamburro M.** 2010. Prevalence and biomolecular characterization of *Campylobacter* spp. isolated from retail meat. *J Food Prot* 73: 720-8.
354. **Sanchez R., Fernandez-Baca V., Diaz M.D., Munoz P., Rodriguez-Creixems M., and Bouza E.** 1994. Evolution of susceptibilities of *Campylobacter* spp. to quinolones and macrolides. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 1879-82.
355. **Sanz J.C., de los Rios R., Lopez-Portoles J.A., Taveira J.A., Simon C., and Echeita M.A.** 2006. [Description of an outbreak of *Campylobacter jejuni* gastroenteritis and molecular characterization of the implicated strain]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 24: 437-9.
356. **Scallan E., Hoekstra R.M., Angulo F.J., Tauxe R.V., Widdowson M.A., Roy S.L., Jones J.L., and Griffin P.M.** 2011. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg Infect Dis* 17: 7-15.
357. **Schmidt-Ott R., Pohl S., Burghard S., Weig M., and Gross U.** 2005. Identification and characterization of a major subgroup of conjugative *Campylobacter jejuni* plasmids. *J Infect* 50: 12-21.
358. **Schouls L.M., Reulen S., Duim B., Wagenaar J.A., Willems R.J., Dingle K.E., Colles F.M., and Van Embden J.D.** 2003. Comparative genotyping of *Campylobacter jejuni* by amplified fragment length polymorphism, multilocus sequence typing, and short repeat sequencing: strain diversity, host range, and recombination. *J Clin Microbiol* 41: 15-26.
359. **Schwartz D.C., Saffran W., Welsh J., Haas R., Goldenberg M., and Cantor C.R.** 1983. New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 47 Pt 1: 189-95.
360. **Sebald M., and Veron M.** 1963. [Base DNA Content and Classification of Vibrios]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 105: 897-910.
361. **Sellars M.J., Hall S.J., and Kelly D.J.** 2002. Growth of *Campylobacter jejuni* supported by respiration of fumarate, nitrate, nitrite, trimethylamine-N-oxide, or dimethyl sulfoxide requires oxygen. *J Bacteriol* 184: 4187-96.
362. **Shane S.M., Gifford D.H., and Yogasundram K.** 1986. *Campylobacter jejuni* contamination of eggs. *Vet Res Commun* 10: 487-92.
363. **Sheppard S.K., Colles F., Richardson J., Cody A.J., Elson R., Lawson A., Brick G., Meldrum R., Little C.L., Owen R.J. and others.** 2010. Host association of *Campylobacter* genotypes transcends geographic variation. *Appl Environ Microbiol* 76: 5269-77.
364. **Sheppard S.K., Dallas J.F., MacRae M., McCarthy N.D., Sproston E.L., Gormley F.J., Strachan N.J., Ogden I.D., Maiden M.C., and Forbes K.J.** 2009. *Campylobacter* genotypes from food animals, environmental sources and clinical disease in Scotland 2005/6. *Int J Food Microbiol* 134: 96-103.

365. Sheppard S.K., Dallas J.F., Strachan N.J., MacRae M., McCarthy N.D., Wilson D.J., Gormley F.J., Falush D., Ogden I.D., Maiden M.C. and others. 2009. *Campylobacter* genotyping to determine the source of human infection. Clin Infect Dis 48: 1072-8.
366. Sheppard S.K., Dallas J.F., Wilson D.J., Strachan N.J., McCarthy N.D., Jolley K.A., Colles F.M., Rotariu O., Ogden I.D., Forbes K.J. and others. 2010. Evolution of an agriculture-associated disease causing *Campylobacter coli* clade: evidence from national surveillance data in Scotland. PLoS One 5: e15708.
367. Sheppard S.K., McCarthy N.D., Falush D., and Maiden M.C. 2008. Convergence of *Campylobacter* species: implications for bacterial evolution. Science 320: 237-9.
368. Shreeve J.E., Toszeghy M., Pattison M., and Newell D.G. 2000. Sequential spread of *Campylobacter* infection in a multipen broiler house. Avian Dis 44: 983-8.
369. Shreeve J.E., Toszeghy M., Ridley A., and Newell D.G. 2002. The carry-over of *Campylobacter* isolates between sequential poultry flocks. Avian Dis 46: 378-85.
370. Siemer B.L., Nielsen E.M., and On S.L. 2005. Identification and molecular epidemiology of *Campylobacter coli* isolates from human gastroenteritis, food, and animal sources by amplified fragment length polymorphism analysis and Penner serotyping. Appl Environ Microbiol 71: 1953-8.
371. Silva J., Leite D., Fernandes M., Mena C., Gibbs P.A., and Teixeira P. 2011. *Campylobacter* spp. as a Foodborne Pathogen: A Review. Front Microbiol 2: 200.
372. Skelly C., and Weinstein P. 2003. Pathogen survival trajectories: an eco-environmental approach to the modeling of human campylobacteriosis ecology. Environ Health Perspect 111: 19-28.
373. Skirrow M.B., Jones D.M., Sutcliffe E., and Benjamin J. 1993. *Campylobacter* bacteraemia in England and Wales, 1981-91. Epidemiol Infect 110: 567-73.
374. Skov M.N., Spencer A.G., Hald B., Petersen L., Nauerby B., Carstensen B., and Madsen M. 2004. The role of litter beetles as potential reservoir for *Salmonella enterica* and thermophilic *Campylobacter* spp. between broiler flocks. Avian Dis 48: 9-18.
375. Slater E., and Owen R.J. 1998. Subtyping of *Campylobacter jejuni* Penner heat-stable (HS) serotype 11 isolates from human infections. J Med Microbiol 47: 353-7.
376. Smith H.V., Caccio S.M., Cook N., Nichols R.A., and Tait A. 2007. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. Vet Parasitol 149: 29-40.
377. Smith T. 1919. The Etiological Relation of Spirilla (*Vibrio Fetus*) to Bovine Abortion. J Exp Med 30: 313-23.
378. Snelling W.J., Matsuda M., Moore J.E., and Dooley J.S. 2005. *Campylobacter jejuni*. Lett Appl Microbiol 41: 297-302.
379. Snelling W.J., McKenna J.P., Hack C.J., Moore J.E., and Dooley J.S. 2006. An examination of the diversity of a novel *Campylobacter* reservoir. Arch Microbiol 186: 31-40.
380. Snelling W.J., McKenna J.P., Lecky D.M., and Dooley J.S. 2005. Survival of *Campylobacter jejuni* in waterborne protozoa. Appl Environ Microbiol 71: 5560-71.
381. Son I., Englen M.D., Berrang M.E., Fedorka-Cray P.J., and Harrison M.A. 2007. Antimicrobial resistance of *Arcobacter* and *Campylobacter* from broiler carcasses. Int J Antimicrob Agents 29: 451-5.
382. Sonnevend A., and Pal T. 2006. Heterogeneity of non-serotypable *Campylobacter jejuni* isolates. Acta Microbiol Immunol Hung 53: 171-81.
383. Sopwith W., Birtles A., Matthews M., Fox A., Gee S., James S., Kempster J., Painter M., Edwards-Jones V., Osborn K. and others. 2010. Investigation of food and environmental exposures relating to the epidemiology of *Campylobacter coli* in humans in Northwest England. Appl Environ Microbiol 76: 129-35.
384. Stahl M., Friis L.M., Nothaft H., Liu X., Li J., Szymanski C.M., and Stintzi A. 2011. L-fucose utilization provides *Campylobacter jejuni* with a competitive advantage. Proc Natl Acad Sci U S A 108: 7194-9.
385. Steel H.C., Theron A.J., Cockeran R., Anderson R., and Feldman C. 2012. Pathogen- and host-directed anti-inflammatory activities of macrolide antibiotics. Mediators Inflamm 2012: 584262.

386. Stern N.J., Robach M.C., Cox N.A., and Musgrove M.T. 2002. Effect of drinking water chlorination on *Campylobacter* spp. colonization of broilers. *Avian Dis* 46: 401-4.
387. Stoddard R.A., Miller W.G., Foley J.E., Lawrence J., Gulland F.M., Conrad P.A., and Byrne B.A. 2007. *Campylobacter insulaenigrae* isolates from northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*) in California. *Appl Environ Microbiol* 73: 1729-35.
388. Strachan N.J., and Forbes K.J. 2010. The growing UK epidemic of human campylobacteriosis. *Lancet* 376: 665-7.
389. Strother K.O., Steelman C.D., and Gbur E.E. 2005. Reservoir competence of lesser mealworm (*Coleoptera: Tenebrionidae*) for *Campylobacter jejuni* (*Campylobacterales: Campylobacteraceae*). *J Med Entomol* 42: 42-7.
390. Suzuki H., and Yamamoto S. 2009. *Campylobacter* contamination in retail poultry meats and by-products in the world: a literature survey. *J Vet Med Sci* 71: 255-61.
391. Szymanski C.M., Michael F.S., Jarrell H.C., Li J., Gilbert M., Larocque S., Vinogradov E., and Brisson J.R. 2003. Detection of conserved N-linked glycans and phase-variable lipooligosaccharides and capsules from campylobacter cells by mass spectrometry and high resolution magic angle spinning NMR spectroscopy. *J Biol Chem* 278: 24509-20.
392. Taylor D.E., De Grandis S.A., Karmali M.A., and Fleming P.C. 1981. Transmissible plasmids from *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother* 19: 831-5.
393. Templeton J.M., De Jong A.J., Blackall P.J., and Mifflin J.K. 2006. Survival of *Campylobacter* spp. in darkling beetles (*Alphitobius diaperinus*) and their larvae in Australia. *Appl Environ Microbiol* 72: 7909-11.
394. Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Murray B.E., Persing D.H., and Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33: 2233-9.
395. Tenson T., Lovmar M., and Ehrenberg M. 2003. The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *J Mol Biol* 330: 1005-14.
396. Ternhag A., Torner A., Svensson A., Giesecke J., and Ekdahl K. 2005. Mortality following *Campylobacter* infection: a registry-based linkage study. *BMC Infect Dis* 5: 70.
397. Thaker M., Spanogiannopoulos P., and Wright G.D. 2010. The tetracycline resistome. *Cell Mol Life Sci* 67: 419-31.
398. Thakur S., White D.G., McDermott P.F., Zhao S., Kroft B., Gebreyes W., Abbott J., Cullen P., English L., Carter P. and others. 2009. Genotyping of *Campylobacter coli* isolated from humans and retail meats using multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. *J Appl Microbiol* 106: 1722-33.
399. Thibodeau A., Fravalo P., Laurent-Lewandowski S., Guevremont E., Quessy S., and Letellier A. 2011. Presence and characterization of *Campylobacter jejuni* in organically raised chickens in Quebec. *Can J Vet Res* 75: 298-307.
400. Thomas M.K., Majowicz S.E., Sockett P.N., Fazil A., Pollari F., Dore K., Flint J.A., and Edge V.L. 2006. Estimated Numbers of Community Cases of Illness Due to *Salmonella*, *Campylobacter* and Verotoxigenic *Escherichia coli*: Pathogen-specific Community Rates. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 17: 229-34.
401. Thorsteinsdottir T.R., Kristinsson K.G., Fridriksdottir V., and Gunnarsson E. 2008. Antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. isolated from broiler flocks in Iceland 2001-2005. *Microb Drug Resist* 14: 49-53.
402. Trachoo N., Frank J.F., and Stern N.J. 2002. Survival of *Campylobacter jejuni* in biofilms isolated from chicken houses. *J Food Prot* 65: 1110-6.
403. Tu D., Blaha G., Moore P.B., and Steitz T.A. 2005. Structures of MLSBK antibiotics bound to mutated large ribosomal subunits provide a structural explanation for resistance. *Cell* 121: 257-70.
404. Unicomb L.E., O'Reilly L.C., Kirk M.D., Stafford R.J., Smith H.V., Becker N.G., Patel M.S., and Gilbert G.L. 2008. Risk factors for infection with *Campylobacter jejuni* *flaA* genotypes. *Epidemiol Infect* 136: 1480-91.
405. Valdivieso-Garcia A., Harris K., Riche E., Campbell S., Jarvie A., Popa M., Deckert A., Reid-Smith R., and Rahn K. 2007. Novel *Campylobacter* isolation method using hydrophobic grid membrane filter and semisolid medium. *J Food Prot* 70: 355-62.

406. **van Asselt E.D., Jacobs-Reitsma W.F., van Brakel R., van der Voet H., and van der Fels-Klerx H.J.** 2008. *Campylobacter* prevalence in the broiler supply chain in the Netherlands. *Poult Sci* 87: 2166-72.
407. **van Belkum A., Tassios P.T., Dijkshoorn L., Haeggman S., Cookson B., Fry N.K., Fussing V., Green J., Feil E., Gerner-Smidt P. and others.** 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 13 Suppl 3: 1-46.
408. **van Bergen M.A., Dingle K.E., Maiden M.C., Newell D.G., van der Graaf-Van Bloois L., van Putten J.P., and Wagenaar J.A.** 2005. Clonal nature of *Campylobacter fetus* as defined by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 43: 5888-98.
409. **Van Doorn L.J., Verschuuren-Van Haperen A., Van Belkum A., Endtz H.P., Vliegenthart J.S., Vandamme P., and Quint W.G.** 1998. Rapid identification of diverse *Campylobacter lari* strains isolated from mussels and oysters using a reverse hybridization line probe assay. *J Appl Microbiol* 84: 545-50.
410. **van Essen-Zandbergen A., Smith H., Veldman K., and Mevius D.** 2007. Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother* 59: 746-50.
411. **Vandamme P., Debruyne L., De Brandt E., and Falsen E.** 2010. Reclassification of *Bacteroides ureolyticus* as *Campylobacter ureolyticus* comb. nov., and emended description of the genus *Campylobacter*. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 2016-22.
412. **Velayudhan J., and Kelly D.J.** 2002. Analysis of gluconeogenic and anaplerotic enzymes in *Campylobacter jejuni*: an essential role for phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Microbiology* 148: 685-94.
413. **Vellinga A., and Van Loock F.** 2002. The dioxin crisis as experiment to determine poultry-related campylobacter enteritis. *Emerg Infect Dis* 8: 19-22.
414. **Verhoeff-Bakkenes L., Jansen H.A., in 't Veld P.H., Beumer R.R., Zwietering M.H., and van Leusden F.M.** 2011. Consumption of raw vegetables and fruits: a risk factor for *Campylobacter* infections. *Int J Food Microbiol* 144: 406-12.
415. **Vila J., Ruiz J., Goni P., Marcos A., and Jimenez de Anta T.** 1995. Mutation in the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1201-3.
416. **Waldenstrom J., Broman T., Carlsson I., Hasselquist D., Achterberg R.P., Wagenaar J.A., and Olsen B.** 2002. Prevalence of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter coli* in different ecological guilds and taxa of migrating birds. *Appl Environ Microbiol* 68: 5911-7.
417. **Wang Y., Huang W.M., and Taylor D.E.** 1993. Cloning and nucleotide sequence of the *Campylobacter jejuni gyrA* gene and characterization of quinolone resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 457-63.
418. **Wang Y., and Taylor D.E.** 1990. Chloramphenicol resistance in *Campylobacter coli*: nucleotide sequence, expression, and cloning vector construction. *Gene* 94: 23-8.
419. **Wardak S., Szych J., Zasada A.A., and Gierczynski R.** 2007. Antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* clinical isolates from Poland. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 1123-5.
420. **Wassenaar T.M.** 2011. Following an imaginary *Campylobacter* population from farm to fork and beyond: a bacterial perspective. *Lett Appl Microbiol* 53: 253-63.
421. **Wassenaar T.M., Fernandez-Astorga A., Alonso R., Marteinsson V.T., Magnusson S.H., Kristoffersen A.B., and Hofshagen M.** 2009. Comparison of *Campylobacter fla*-SVR genotypes isolated from humans and poultry in three European regions. *Lett Appl Microbiol* 49: 388-95.
422. **Wassenaar T.M., Fry B.N., and van der Zeijst B.A.** 1995. Variation of the flagellin gene locus of *Campylobacter jejuni* by recombination and horizontal gene transfer. *Microbiology* 141 (Pt 1): 95-101.
423. **Wassenaar T.M., Geilhausen B., and Newell D.G.** 1998. Evidence of genomic instability in *Campylobacter jejuni* isolated from poultry. *Appl Environ Microbiol* 64: 1816-21.
424. **Wassenaar T.M., and Newell D.G.** 2000. Genotyping of *Campylobacter* spp. *Appl Environ Microbiol* 66: 1-9.
425. **Wedderkopp A., Rattenborg E., and Madsen M.** 2000. National surveillance of *Campylobacter* in broilers at slaughter in Denmark in 1998. *Avian Dis* 44: 993-9.

426. **Wierup M.** 2001. The Swedish experience of the 1986 year ban of antimicrobial growth promoters, with special reference to animal health, disease prevention, productivity, and usage of antimicrobials. *Microb Drug Resist* 7: 183-90.
427. **Wilson D.J., Gabriel E., Leatherbarrow A.J., Cheesbrough J., Gee S., Bolton E., Fox A., Fearnhead P., Hart C.A., and Diggle P.J.** 2008. Tracing the source of campylobacteriosis. *PLoS Genet* 4: e1000203.
428. **Wilson D.L., Rathinam V.A., Qi W., Wick L.M., Landgraf J., Bell J.A., Plovianich-Jones A., Parrish J., Finley R.L., Mansfield L.S. and others.** 2010. Genetic diversity in *Campylobacter jejuni* is associated with differential colonization of broiler chickens and C57BL/6J IL10-deficient mice. *Microbiology* 156: 2046-57.
429. **Wirz S.E., Overesch G., Kuhnert P., and Korczak B.M.** 2010. Genotype and antibiotic resistance analyses of *Campylobacter* isolates from ceca and carcasses of slaughtered broiler flocks. *Appl Environ Microbiol* 76: 6377-86.
430. **Wittwer M., Keller J., Wassenaar T.M., Stephan R., Howald D., Regula G., and Bissig-Choisat B.** 2005. Genetic diversity and antibiotic resistance patterns in a campylobacter population isolated from poultry farms in Switzerland. *Appl Environ Microbiol* 71: 2840-7.
431. **Woodward D.L., and Rodgers F.G.** 2002. Identification of *Campylobacter* heat-stable and heat-labile antigens by combining the Penner and Lior serotyping schemes. *J Clin Microbiol* 40: 741-5.
432. **Workman S.N., Mathison G.E., and Lavoie M.C.** 2008. An investigation of sources of *Campylobacter* in a poultry production and packing operation in Barbados. *Int J Food Microbiol* 121: 106-11.
433. **Yan W., Chang N., and Taylor D.E.** 1991. Pulsed-field gel electrophoresis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* genomic DNA and its epidemiologic application. *J Infect Dis* 163: 1068-72.
434. **Yoshida H., Bogaki M., Nakamura S., Ubukata K., and Konno M.** 1990. Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* *norA* gene, which confers resistance to quinolones. *J Bacteriol* 172: 6942-9.
435. **Yu J.H., Kim N.Y., Cho N.G., Kim J.H., Kang Y.A., and Lee H.G.** 2010. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* outbreak in a middle school in Incheon, Korea. *J Korean Med Sci* 25: 1595-600.
436. **Zanoni R.G., Debruyne L., Rossi M., Revez J., and Vandamme P.** 2009. *Campylobacter cuniculorum* sp. nov., from rabbits. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 1666-71.
437. **Zarogoulidis P., Papanas N., Kioumis I., Chatzaki E., Maltezos E., and Zarogoulidis K.** 2012. Macrolides: from in vitro anti-inflammatory and immunomodulatory properties to clinical practice in respiratory diseases. *Eur J Clin Pharmacol* 68: 479-503.
438. **Zhao S., Young S.R., Tong E., Abbott J.W., Womack N., Friedman S.L., and McDermott P.F.** 2010. Antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates from retail meat in the United States between 2002 and 2007. *Appl Environ Microbiol* 76: 7949-56.
439. **Zweifel C., Scheu K.D., Keel M., Renggli F., and Stephan R.** 2008. Occurrence and genotypes of *Campylobacter* in broiler flocks, other farm animals, and the environment during several rearing periods on selected poultry farms. *Int J Food Microbiol* 125: 182-7.